

# Desenvolvimento e aplicação de um biossensor para monitorização de creatinina, um biomarcador associado a doenças emergentes



Ricardo Miguel Bessa de Castro

Outubro de 2013

Orientação: Maria Goreti Ferreira Sales

Co-Orientação:

## Dissertação / Tese de Mestrado

**RICARDO  
CASTRO**

**Desenvolvimento e aplicação de um biossensor  
para monitorização de creatinina, um  
biomarcador associado a doenças emergentes**

# Agradecimentos

À Doutora Goreti Sales pela sua incansável disponibilidade e supervisão.

À Doutora Maria do Carmo, pela sua insistência e por um telefonema importantíssimo.

A toda a equipa do Biomark.

Aos meus pais e noiva, Cátia Alexandra Novais Costa, por todo o apoio e amor que sempre me deram.

# Resumo

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um material sensor para creatinina por impressão molecular em estrutura polimérica (MIP) e a sua aplicação no desenvolvimento de um dispositivo de natureza potenciométrica para a determinação da molécula alvo em fluidos biológicos. A creatinina é um dos biomarcadores mais utilizados no acompanhamento da doença renal, já que é um bom indicador da taxa de filtração glomerular (TFG).

Os materiais biomiméticos desenhados para interação com a creatinina foram obtidos por polimerização radicalar, recorrendo a monómeros de ácido metacrílico ou de vinilpiridina e a um agente de reticulação apropriado. De modo a aferir o efeito da impressão da creatinina na resposta dos materiais MIP à sua presença, foram também preparados e avaliados materiais de controlo, obtidos sem impressão molecular (NIP). O controlo da constituição química destes materiais, incluindo a extração da molécula impressa, foi realizado por Espectroscopia de Raman e de Infravermelho com Transformada de Fourier. A afinidade de ligação entre estes materiais e a creatinina foi também avaliada com base em estudos cinéticos.

Todos os materiais descritos foram integrados em membranas selectivas de eléctrodos seletivos de ião, preparadas sem ou com aditivo iónico lipófilo, de carga negativa ou positiva. A avaliação das características gerais de funcionamento destes eléctrodos, em meios de composição e pH diferentes, indicaram que as membranas com materiais impressos e aditivo aniónico eram as únicas com utilidade analítica. Os melhores resultados foram obtidos em solução tampão *Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)*, PIPES, de pH 2,8, condição que permitiu obter uma resposta *quasi-Nernstiana*, a partir de  $1,6 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Estes eléctrodos demonstraram ainda uma boa selectividade ao apresentaram uma resposta preferencial para a creatinina quando na presença de ureia, carnitina, glucose, ácido ascórbico, albumina, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, cloreto de sódio e sulfato de magnésio. Os eléctrodos foram ainda aplicados com sucesso na análise de amostras sintéticas de urina, quando os materiais sensores eram baseados em ácido metacrílico, e soro, quando os materiais sensores utilizados eram baseados em vinilpiridina.

Palavras-chave: polímeros de impressão molecular; eléctrodos-seletivos de ião; potenciometria; biomarcadores; creatinina.

# Abstract

This work describes the development of a sensor material for creatinine, prepared by molecular imprinting in a polymeric structure and its application in the development of a device of potentiometric nature for the determination of creatinine in biological fluids. Creatinine is one of the most commonly used biomarkers in monitoring renal function, since it is a good indicator of glomerular filtration rate (TFG).

Different biomimetic materials designed to interact with creatinine were synthesized by free radical polymerization using the monomers methacrylic acid or vinylpyridine and an appropriate cross-linking agent. In order to assess the effect of the imprinting in the response of the imprinted materials to creatinine, control non-imprinted materials were also prepared. Raman spectroscopy and Fourier transformed infrared spectroscopy were used to control the chemical composition of such materials and the extraction of the imprinted molecule from the polymeric matrix. The binding affinity between these materials and creatinine was also evaluated based on kinetic studies.

All of the described materials were incorporated into selective membranes in ion-selective electrodes, prepared with or without ionic lipophilic additive, of positive or negative charge. Evaluation of the analytical features of these electrodes in different composition and pH media indicated that only membranes with imprinted materials and anionic additive were of analytical interest. The best results were obtained with buffer Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid), PIPES at pH 2.8, leading to a near-Nernstian response from  $1.6 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. These electrodes also showed high selectivity, indicating a preferential response to creatinine in the presence of urea, carnitine, glucose, ascorbic acid, albumin, calcium chloride, potassium chloride, sodium chloride and magnesium sulfate. The electrodes were applied successfully to the analysis of samples of synthetic urine, when the sensor materials used were based on methacrylic acid, and serum, when the sensor materials used were based on vinylpyridine.

Keywords: molecularly-imprinted polymers; ion-selective electrodes; potentiometry; biomarkers; creatinine.

# Índice

1.	Introdução .....	1
1.1.	A Creatinina .....	2
1.2.	A taxa de filtração glomerular .....	3
1.3.	Métodos de doseamento da creatinina.....	5
1.3.1.	Métodos separativos .....	5
1.3.1.1.	A cromatografia .....	5
1.3.1.2.	A eletroforese capilar.....	6
1.3.2.	Métodos óticos .....	8
1.3.3.	Métodos electroanalíticos.....	10
1.4.	Potenciometria .....	11
1.4.1.	Considerações teóricas .....	13
1.4.2.	Elétrodo de referência .....	17
1.4.2.1.	Elétrodo de calomelanos .....	17
1.4.2.2.	Elétrodo de prata/cloreto de prata .....	18
1.4.2.3.	Elétrodo padrão de hidrogénio .....	19
1.4.3.	Elétrodo indicador .....	20
1.4.3.1.	Eléttodos metálicos .....	20
1.4.3.2.	Eléttodos seletivos de ião.....	21
1.4.3.2.1.	Eléttodos de membrana cristalina .....	22
1.4.3.2.2.	Eléttodos de membrana não cristalina.....	23
1.5.	Polímeros de Impressão Molecular .....	26
2.	Descrição Experimental .....	31
2.1.	Material e aparelhos utilizados .....	31
2.2.	Reagentes.....	32
2.3.	Construção dos eléttodos .....	33

2.4.	Preparação do sensor .....	34
2.5.	Análise da superfície dos MIPs preparados .....	34
2.6.	Preparação das membranas .....	34
2.7.	Avaliação comparativa dos eletrodos .....	36
2.8.	Afinidade para o material biomimético.....	38
2.9.	Análise das amostras .....	38
3.	Resultados experimentais .....	39
3.1.	Análise de superfície dos materiais .....	39
3.1.1.	Materiais de MAA .....	40
3.1.2.	Materiais de VP .....	43
3.2.	Afinidade dos materiais para a creatinina.....	45
3.3.	Estudos preliminares de calibração.....	46
3.4.	Efeito do pH .....	48
3.4.1.	HEPES/pH 7,4.....	49
3.4.2.	HEPES/pH 4,6.....	50
3.4.3.	HEPES/pH 2,5.....	52
3.5.	Efeito da natureza da solução tampão .....	54
3.5.1.	MES/pH 2,8.....	55
3.5.2.	PIPES/pH 2,8 .....	56
3.5.3.	Síntese do efeito solução tampão.....	58
3.6.	Seletividade dos sensores .....	59
3.7.	Análise de amostras biológicas .....	61
4.	Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros .....	63
5.	Referências Bibliográficas .....	65

# Índice Figuras

Figura 1-1 Estruturas tautoméricas da creatinina [8].....	2
Figura 1-2 Diagrama esquemático de um processo de eletroforese capilar [18]. .....	7
Figura 1-3 Esquema de sistema de espectrofotometria [12]. .....	9
Figura 1-4 Sistema de referência para o eletrodo de pH de “Ross”. .....	12
Figura 1-5 Características gerais da curva de calibração. ....	14
Figura 1-6 Representação gráfica do tempo de resposta, $t$ ( $\Delta E/\Delta t$ ), de uma célula de eletrodo seletivo de ião, considerando uma espécie iônica de carga +1. ....	16
Figura 1-7 Eletrodo de calomelanos. ....	17
Figura 1-8 Esquema representativo de um eletrodo de prata/cloreto de prata de dupla junção. ....	19
Figura 1-9 Esquema de um eletrodo padrão de hidrogênio [51]. ....	20
Figura 1-10 Representação esquemática de ESIs com membrana cristalina, com solução de referência interna (esquerda) ou sem solução de referência interna (direita).....	22
Figura 1-11 Representação esquemática de ESI de membrana de vidro simples (esquerda) ou combinado (direita), seletivo a $H^+$ . ....	23
Figura 1-12 Representação esquemática do corte transversal de uma membrana de vidro constituída por silicatos e sua permuta com $H^+$ do meio externo ou interno. ....	24
Figura 1-13 ESI de membrana não cristalina, de natureza polimérica, e sua ligação a um tubo cilíndrico que funciona como corpo do eletrodo. ....	25
Figura 1-14 Esquema exemplificativo da síntese de polímeros de impressão molecular, com destaque para as suas quatro fases principais. ....	26



Figura 2-1 Potenciômetro, marca Crison, modelo GLP 21, com suporte de agitação magnética lateral e suporte de dois eletrodos de formato convencional. ....	32
Figura 2-2 Corpos dos ESI, baseado num tubo de Perspex® atravessado por um fio elétrico preso a uma matriz condutora de grafite e na qual foi aplicada a membrana seletiva. ....	33
Figura 2-3 Eletrodos seletivos de creatinina construídos por aplicação da membrana seletiva na extremidade de um tubo de Perspex®, onde se encontrava um suporte condutor sólido à base de grafite. ....	36
Figura 3-1 Espectro de Raman da superfície de materiais preparados em MAA, incluindo-se NIP (3º espectro) e MIP antes (1º espectro) e depois da remoção da creatinina (2º espectro). ....	40
Figura 3-2 Mapa de distribuição de intensidade de Raman da superfície do material MIP/MAA após extração de creatinina, representado para o deslocamento de $1000\text{ cm}^{-1}$ . ....	41
Figura 3-3 Espectros de FTIR das soluções de lavagem do MIP/MAA, da solução de lavagem sem qualquer creatinina e com creatinina na concentração especificada. ....	42
Figura 3-4 Espectro de Raman da superfície dos MIPs e NIP preparados em VP. ....	43
Figura 3-5 Mapa de distribuição de intensidade de Raman da superfície do material MIP/VP após extração de creatinina, representado para o deslocamento de $1000\text{ cm}^{-1}$ . ....	44
Figura 3-6 Espectros de FTIR das soluções de lavagem do MIP/VP, da solução de lavagem sem qualquer creatinina e com creatinina na concentração especificada. ....	45
Figura 3-7 Representação gráfica das curvas de calibração em água dos diferentes eletrodos, agrupadas segundo o material sensor que continham. ....	47
Figura 3-8 Representação gráfica das curvas de calibração em tampão HEPES, pH 7,4, dos diferentes eletrodos, agrupadas segundo o material sensor que continham. ....	50

Figura 3-9 Representação gráfica das curvas de calibração em tampão HEPES, pH 4,6, dos diferentes elétrodo, agrupadas segundo o material sensor que continham. ....	52
Figura 3-10 Representação gráfica das curvas de calibração em tampão HEPES, pH 2,5, dos diferentes elétrodo, agrupadas segundo o material sensor que continham. ....	53
Figura 3-11 Representação gráfica das curvas de calibração em tampão MES, pH 2,8, dos diferentes elétrodo, agrupadas segundo o material sensor que continham. ....	56
Figura 3-12 Representação gráfica das curvas de calibração em tampão PIPES, pH 2,8, dos diferentes elétrodo, agrupadas segundo o material sensor que continham. ....	57

# Índice tabelas

Tabela 1-1 Relação entre vários estágios da insuficiência renal e a taxa de filtração molecular [11].....	4
Tabela 1-2 Número de laboratórios que utilizavam ESIs e analisadores de fotometria de chama para medições de eletrólitos [45]. ....	13
Tabela 1-3 Descrição sumária dos processos de síntese de MIPs de creatinina. ....	29
Tabela 2-1 Composição (em g) das membranas seletivas relativas a cada ESI construído. ....	35
Tabela 3-1 Resultados experimentais das curvas de calibração dos elétrodos avaliados em água, destacando elétrodos com declive catiónico. ....	48
Tabela 3-2 Resultados experimentais das curvas de calibração dos elétrodos avaliados em tampão HEPES, pH 7,4, destacando elétrodos com declive catiónico.....	49
Tabela 3-3 Resultados experimentais das curvas de calibração dos elétrodos avaliados em tampão HEPES, pH 4,6, destacando elétrodos com declive catiónico mais elevado. ....	51
Tabela 3-4 Resultados experimentais das curvas de calibração dos elétrodos avaliados em tampão HEPES, pH 2,5, destacando elétrodos com declive catiónico mais elevado. ....	53
Tabela 3-5 Resultados experimentais das curvas de calibração dos elétrodos avaliados em tampão MES, pH 2,8, destacando elétrodos com declive catiónico mais elevado. ....	55
Tabela 3-6 Resultados experimentais das curvas de calibração dos elétrodos avaliados em tampão PIPES, pH 2,8, destacando elétrodos com declive catiónico mais elevado. ....	57
Tabela 3-7 Resumo dos resultados obtidos com soluções de creatinina preparadas em diferentes soluções tampão.....	58
Tabela 3-8 Avaliação dos coeficientes seletividade de espécies interferentes.....	60

Tabela 3-9 Resultados da análise de amostras de Urina com os ESIs selecionados.	
.....	61
Tabela 3-10 Resultados da análise de amostras de Soro com os ESIs selecionados.	
.....	62

# Lista de Abreviaturas

ADP - Adenosina difosfato;

ATP - Adenosina trifosfato;

BPO - peróxido de benzoilo

Brta - brometo de tetraoctilamonio

EC - Electroforese capilar

EDGMA - Etileno glicol dimetacrilato

EOF - “Electroosmotic Flow “

ESI - Eléctrodo Seletivo de Ião

F.E.M. - força eletromotriz da célula

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier, do inglês “Fourier transform infrared spectroscopy”

HEPES – 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

I - Força iónica

IUPAC – “International Union of Pure and Applied Chemistry”

LD - Limite de Detecção

LIRL - Limite Inferior de Resposta Linear

MAA - Ácido metacrílico

MES - 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acide

MIP - Polímeros de impressão molecular (do inglês, Molecularly Imprinted Polymers);

NFOE - 2-Nitrofeniloctil éter

NIP – Polímero sem impressão molecular - do inglês “Non imprinted polymer”

PIPES – Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid

PVC - Policloreto de vinil

SiOH - grupos silanóis ácidos

TFG - Taxa de filtração glomerular;

THF - tetrahidrofurano

Tkcb - Tetrakis-4-(clorofenil)borato

UV/Vis - Ultra violeta e visível;

VP - 4-Vinilpiridina

## 1. Introdução

Nos últimos anos a comunidade científica tem apresentado uma preocupação crescente relativamente à doença renal, devido ao elevado do número de pessoas que sofrem desta enfermidade. De acordo com dados mais recentes da Organização Mundial de Saúde, a doença renal encontra-se entre as vinte principais causas de morte em Portugal, ocupando a 12ª posição. Segundo dados de 2011, esta doença provocou 2191 mortes em Portugal, o que corresponde a 2,71% do total de óbitos nesse período [1]. Segundo dados da Sociedade Portuguesa de Nefrologia, estima-se que entre 500 a 800 mil pessoas tenham algum tipo de limitação da função renal [2].

A doença renal corresponde a um processo crónico, praticamente assintomático na fase inicial e de progressão tipicamente silenciosa. Quando detectada, encontra-se habitualmente nos seus estágios mais avançados, momento em que se torna mais difícil implementar um tratamento eficaz e diminuir os efeitos colaterais associados. Neste sentido, torna-se fundamental e urgente o diagnóstico precoce da doença renal [3]. Para este efeito, os investigadores procuram ainda hoje identificar um conjunto de biomarcadores que possam ser associadas à presença de doença renal. A monitorização destes compostos pode constituir uma ferramenta essencial, não invasiva, na triagem das pessoas com esta doença. A creatinina é um dos biomarcadores mais utilizados neste contexto e aquele onde não restam dúvidas sobre a sua indicação preditiva [4].

Os valores de creatinina na urina podem ainda associar-se à presença de cancro do estômago. Esta associação decorre das diferenças observadas entre grupos de pessoas saudáveis e de doentes com cancro do estômago relativamente à razão iodo/creatinina na urina. Enquanto cerca de 60% dos doentes incluídos num estudo apresentavam uma deficiência do rácio iodo/creatinina, 66,7% dos indivíduos saudáveis apresentavam valores

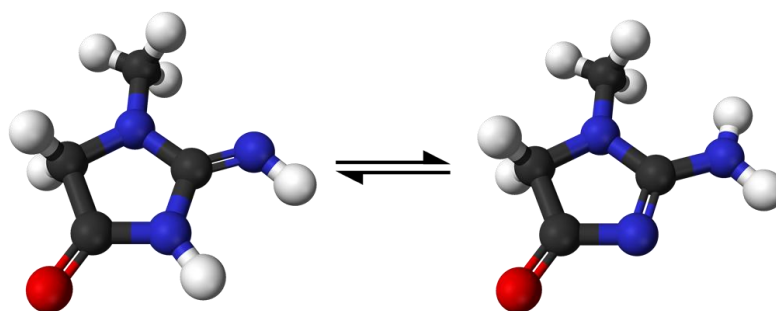
iodo/creatinina normais e apenas de 14,3% destes indivíduos apresentavam deficiência moderada [5].

A creatinina é, por isso, um biomarcador cuja monitorização de rotina é de elevada importância na deteção e/ou no acompanhamento da doença renal ou cancro de estômago.

### 1.1. A Creatinina

A creatinina é o nome trivial atribuído ao composto 2-Amino-1-metil-5*H*-imidazol-4-ona. Em virtude da elevada ressonância interna na sua estrutura, ela pode apresentar-se numa das suas duas formas tautómeras, representadas na Figura 1.1 [6]. Do ponto de vista químico, pode dizer-se que a creatinina resulta da ciclização espontânea da creatina.

A creatinina surge no organismo humano como produto da degradação da fosfocreatina, a creatina fosforilada que fornece em condições anaeróbias um grupo fosfato à adenosina difosfato (ADP) durante os primeiros 2-7 segundos de esforço muscular ou neuronal intenso. Em condições normais, a creatinina produz-se de forma constante no corpo humano, segundo uma taxa que é diretamente proporcional à massa muscular [7].



**Figura 1-1** Estruturas tautoméricas da creatinina [8].

A creatinina é lançada na corrente sanguínea e posteriormente eliminada pelo rim. A creatinina é excretada essencialmente ao nível da filtração glomerular, sendo livremente filtrada pelo glomérulo [9,10]. Quando os rins apresentam alguma perturbação no seu



funcionamento, verificam-se, por consequência, um aumento dos níveis de creatinina no soro e uma diminuição desses níveis na urina.

Dado que a creatinina não é reabsorvida a nível renal, nem metabolizada pelo próprio rim, os níveis de creatinina no sangue e na urina podem, por isso, ser diretamente relacionados com a qualidade da função renal. Os parâmetros mais frequentemente utilizados para este efeito são a concentração da creatinina sérica (no soro), a depuração da creatinina endógena e a TFG, estimada com base na creatinina sérica [10].

## **1.2. A taxa de filtração glomerular**

Os rins filtram o sangue e expulsam os produtos finais do metabolismo proteico, enquanto preservam solutos específicos, como proteínas e outros componentes celulares [3]. Apenas os nefrónios ativos do rim contribuem para a depuração plasmática, devendo a redução do seu número implicar uma diminuição global da taxa de filtração de todos os nefrónios [10].

A capacidade do rim depurar uma substância a partir do sangue é expressa pelo volume de plasma que pode ser depurado dessa substância por unidade de tempo, vulgarmente reconhecido como TFG. Em condições ideais, a substância utilizada como marcador de depuração deverá ter a sua concentração plasmática dependente unicamente da depuração renal, devendo o fluxo do marcador no filtrado glomerular ser igual ao fluxo do marcador excretado.

Assim, sabendo que o fluxo do marcador filtrado é igual à TFG vezes a concentração plasmática (P):

$$\text{Concentração do marcador filtrado} = \text{TFG (ml/min)} \times P \text{ (mg/ml)} \quad (\text{equação 1.1})$$

e que o fluxo do marcador excretado é igual ao produto da concentração na urina (U) e do fluxo urinário (V),

$$\text{Concentração do marcador excretado} = U \text{ (mg/ml)} \times V \text{ (ml/min)} \quad (\text{equação 1.2})$$

o cálculo da TFG pode ser obtido por:

$$TFG = \frac{U \times V}{P} \quad (\text{equação 1.3})$$

No caso específico de utilização de creatinina para o cálculo da TFG, e desprezando-se a percentagem reduzida de creatinina que é excretada por secreção tubular, isto é, considerando que toda a creatinina urinária é proveniente da filtração glomerular, pode-se afirmar que:

$$TFG \times \text{fluxo de creatinina sérica} = \text{fluxo de creatinina urinária} \times \text{fluxo urinário} \quad (\text{equação 1.4})$$

$$TFG = \text{fluxo de creatinina urinária} \times \text{fluxo urinário} / \text{fluxo de creatinina sérica} \quad (\text{equação 1.5, [10]})$$

À medida que a insuficiência renal progride, o valor da TFG diminui. Desta forma, a doença renal assume diferentes estágios segundo os valores da TFG, de acordo com a tabela 1-1 [10,11].

**Tabela 1-1** Relação entre vários estágios da insuficiência renal e a taxa de filtração molecular [11].

Estágio	Descrição	TFG (mL/min por 1.73m <sup>2</sup> )
1	Afeções renais (por exemplo, proteína na urina) com TFG normal	> 90
2	Afeções renais com leve redução na TFG	60 a 89
3	Redução moderada da TFG	30 a 59
4	Redução grave da TFG	15 a 29
5	Falência renal	< 15

A TFG pode ainda ser estimada a partir da concentração sérica de creatinina, podendo recorrer-se a diversas fórmulas para este efeito. A mais conhecida e amplamente utilizada é a fórmula de Cockcroft–Gault expressa na equação seguinte, onde o factor F varia consoante a superfície corporal do indivíduo em análise:

$$TFG = \frac{(140 - idade) \times peso(kg)}{72 \times Concentração\ sérica\ de\ Creatinina(mg/100mL)} \times F \quad (\text{equação 1.6 [12]})$$

Torna-se, assim, fundamental a monitorização na população em geral, de modo mais ou menos frequente, dos teores de creatinina na urina ou no soro. Para este efeito, é possível recorrer a vários métodos analíticos descritos na literatura.

### **1.3. Métodos de doseamento da creatinina**

A creatinina tem sido determinada em fluidos biológicos por métodos separativos, ópticos e electroanalíticos. No essencial, incluem-se aqui métodos baseados em cromatografia iónica, eletroforese capilar de zona, cromatografia eletrocínética micelar, isotacoforese capilar, eletroforese capilar com utilização de microchip, microanálise electroforética mediada com o método Jaffe realizada em modo capilar e alguns métodos simples de espectrofotometria de UV/Vis [13].

#### **1.3.1. Métodos separativos**

Os métodos separativos pressupõem, tal como o próprio nome indica, uma separação física dos constituintes de uma amostra, antes de se efetuar a medição analítica. A cromatografia e a eletroforese capilar (EC) são exemplos de técnicas utilizadas neste domínio para a determinação de creatinina [14].

##### **1.3.1.1. A cromatografia**

A cromatografia é um método de separação de componentes de uma mistura através da distribuição dos seus componentes em duas fases. A fase estacionária permanece fixa e a fase móvel transporta os componentes da mistura através do meio utilizado. A fase estacionária atua como retardador de vários componentes de uma mistura, fazendo com que estes componentes se desloquem com menor velocidade do que a fase móvel. O movimento dos componentes na fase móvel é controlado pelo significado das suas interações com a fase móvel e/ou estacionária. Diferenças entre fatores, como a solubilidade de certos componentes na fase móvel e a força da afinidade destes

componentes para a fase estacionária, fazem com que alguns componentes se desloquem mais rapidamente do que outros, facilitando assim a separação de vários componentes dentro de uma mesma mistura.

Os métodos cromatográficos encontrados na literatura para determinar creatinina incluem, de uma forma geral, procedimentos de separação prévia, baseados em materiais adsorventes que permitem discriminar a creatinina dos demais analitos. Estes métodos encontram-se devidamente revistos na referência [12].

Apesar dos métodos cromatográficos permitirem determinar creatinina em amostras complexas com um elevado grau de seletividade, estes métodos não são adequados a análises de rotina, sobretudo quando se pretende determinar apenas creatinina [15]. Os métodos cromatográficos são tipicamente morosos, no que respeita ao tratamento de amostras e à elaboração de curvas de calibração, e dispendiosos, no que se refere ao equipamento necessário e à necessidade de utilização de reagentes com elevado grau de pureza. Além disso, estes métodos utilizam geralmente solventes orgânicos, pelo que a sua utilização num regime de rotina pode tornar-se nociva para o meio ambiente [16].

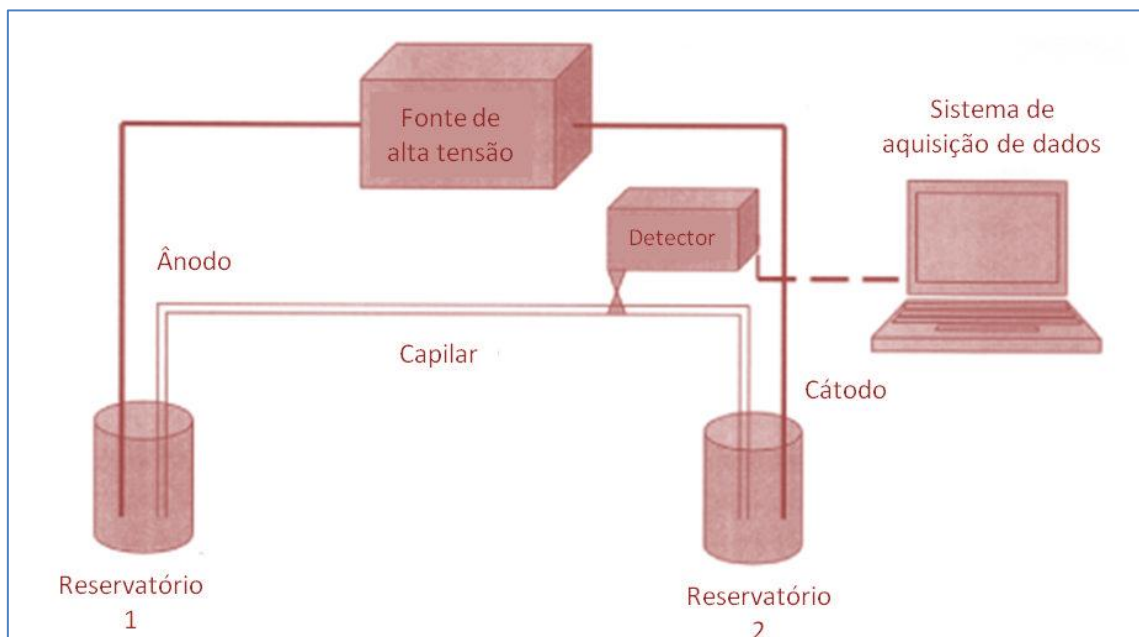
Outra técnica separativa para a determinação de creatinina é a EC, que se apresenta de seguida.

#### **1.3.1.2. A eletroforese capilar**

A EC é uma técnica de separação de alta eficiência baseada na migração de espécies eletricamente carregadas ao longo de um condutor líquido, por aplicação de um campo elétrico num tubo capilar [17]. A utilização de tubos capilares minimiza as limitações relativas ao efeito Joule, uma vez que a geometria do capilar (elevada área superficial interna relativamente ao volume) favorece a dissipação do calor gerado pela passagem de corrente elétrica. Assim, existe a possibilidade de aplicar campos elétricos elevados, resultando numa maior eficiência e numa redução do tempo de análise [18].

Do ponto de vista instrumental, a EC compreende uma fonte de alta tensão regulável, ligada através de eletrodos a dois reservatórios que contêm uma solução de eletrólitos (geralmente uma solução tampão aquosa). Um dos eletrodos é ligado a um cabo condutor da fonte e o outro é conectado a um fio de terra, resultando assim na obtenção de um ânodo e de um cátodo, respectivamente. De seguida, um tubo capilar de sílica fundida é preenchido com uma solução de eletrólitos apropriada e o volume de solução da amostra a analisar é introduzido na extremidade frontal do capilar (usualmente o ânodo), através da substituição de um dos reservatórios da solução tampão por outro que contenha a amostra.

Após a introdução da amostra, as extremidades do capilar e os elétrodos são imersos nos reservatórios para efetuar o contacto elétrico. A deteção dos compostos separados é feita na extremidade terminal do capilar. Na figura seguinte apresenta-se um diagrama esquemático do sistema de EC [17,18].



**Figura 1-2** Diagrama esquemático de um processo de eletroforese capilar [18].

A aplicação de um potencial elétrico através de um tubo capilar gera fluxos eletroforéticos de espécies iónicas e eletro-osmóticos (em inglês, *Electroosmotic Flow*, EOF) de soluções eletrolíticas. O movimento eletroforético é próprio da espécie iónica. Desta forma, os catiões migram em direção ao cátodo (elétrodo negativo) e os aniões migram em direção ao ânodo (elétrodo positivo) e a mobilidade será tanto maior quanto maior for a carga e menor for o tamanho do ião. Por sua vez, o movimento eletrosmótico origina-se no ânodo e segue em direção ao cátodo, conduzindo os iões do soluto ao longo do capilar em direção ao detector. O fluxo eletrosmótico é devido à ionização dos grupos silanóis ácidos (SiOH) existentes na parede interna do tubo capilar de sílica quando estão em contacto com a solução tampão. O fluxo eletroforético (das espécies iónicas) depende da velocidade de cada ião e do EOF. Assim os catiões chegarão mais rapidamente ao detector pois possuem migração eletroforética na mesma direção do EOF, as espécies neutras deslocam-se à

mesma velocidade do EOF e os aniões mais lentamente, já que seus movimentos eletroforéticos são opostos ao fluxo eletrosmótico (são atraídos pelo ânodo). Contudo, todas as espécies do analito presentes serão direcionadas para o sistema de deteção pelo EOF, pois este possui uma velocidade maior que a dos iões [18, 19].

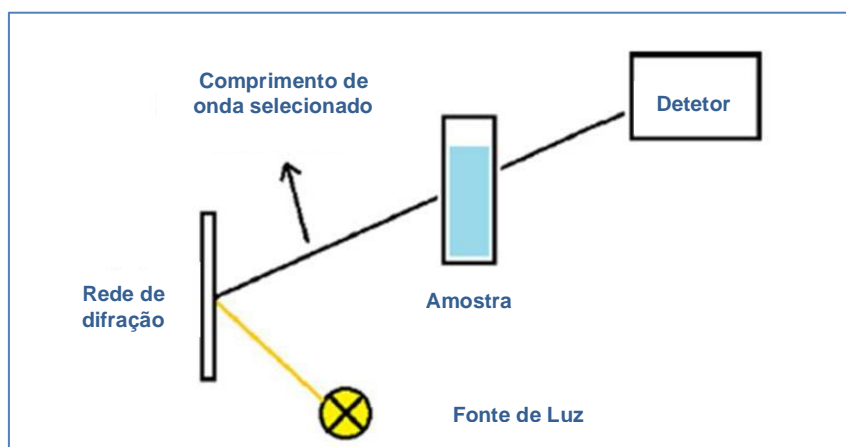
É possível encontrar na literatura alguns métodos que recorrem a EC para a determinação de creatinina, recorrendo à deteção por espectrometria de massa [20,21], por fluorescência [22] ou por condutância [23]. Embora a EC possa ser utilizada na separação de uma grande variedade de espécies químicas, esta requer algumas etapas de pré-tratamento antes da análise propriamente dita. Entre essas etapas encontram-se: a extração, a filtração, a centrifugação e a diluição, que não sendo realizadas em linha, conduzem a um aumento do tempo de análise, a um acréscimo dos riscos de contaminação das amostras, à perda de precisão das medições, à perda de analitos e à utilização indesejável de reagentes e solventes tóxicos [24].

Por estas razões, nem a cromatografia nem a EC apresentam a simplicidade e a rapidez necessárias à determinação de creatinina em modo de rotina. Em alternativa a estas técnicas separativas, é possível também encontrar métodos óticos na literatura.

### **1.3.2. Métodos óticos**

Os métodos óticos baseiam-se na interação entre a radiação eletromagnética e a matéria. A radiação eletromagnética ao atingir a matéria analisada sofre alterações no seu comportamento, podendo ser absorvida, dispersa ou reemitida, promovendo ou não uma variação do comprimento de onda. Podem igualmente ocorrer variações nas propriedades da radiação absorvida, tal como uma mudança do estado de polarização. Os fenómenos óticos existentes incluem a emissão, absorção, dispersão, reflexão e polarização, em toda a gama do espectro eletromagnético.

Os métodos óticos para a determinação de creatinina baseiam-se na conversão da creatinina num composto corado, seja esta conversão por meio de reação química ou bioquímica. A propriedade ótica medida é sempre a absorção de luz, num comprimento de onda específico, tipicamente igual ao valor de máxima absorção nas condições de ensaio utilizadas. Representa-se na Figura 1.3 o esquema geral de funcionamento deste método [12].



**Figura 1-3** Esquema de sistema de espectrofotometria [12].

A maioria dos métodos ópticos utilizados para a determinação de creatinina baseia-se na reação de Jaffe. Nesta reação, a creatinina reage com picrato, em meio alcalino, dando origem ao aparecimento de uma tonalidade alaranjada na solução. O mecanismo pelo qual a reação progride continua, no entanto, por elucidar. Podem encontrar-se na literatura vários estudos sobre este tema, mas sem identificação inequívoca da estrutura do(s) produto(s) final(is) ou do percurso reacional em causa [25-27]. Uma das grandes limitações deste método é a sua reduzida seletividade, sofrendo interferência de vários homólogos estruturais da creatinina (glicociamidina, 5-metilglicociamidine e 5-metilcreatinina) e de outros compostos presentes em amostras biológicas como ascorbato, piruvato e glucose [28]. A temperatura e o pH afetam, também, significativamente os resultados [28,12].

Os métodos alternativos à reação de Jaffe são baseados essencialmente em sistemas enzimáticos, que monitorizam a creatinina com base na sua conversão a creatina [28-30]. De uma forma geral, a creatinina é convertida por catálise enzimática da creatina quinase ou creatina hidrolase em creatina, que por sua vez é transformada em fosfato de creatina com consumo de adenosina trifosfato (ATP). A adenosina difosfato (ADP) resultante desta primeira etapa reage com piruvato fosfoenol numa reação catalisada pela piruvato-quinase, produzindo piruvato que é um composto que pode ser medido por métodos ópticos (espectrofotometria) [31].

Apesar da falta de detalhes teóricos sobre a transformação química em causa na reação de Jaffe e da interferência de alguns constituintes nas amostras, esta reação continua a ser, ainda hoje, a base dos métodos mais utilizados na monitorização de creatinina em amostras biológicas [32,33]. Os motivos da sua ampla utilização prendem-se

sobretudo com a elevada simplicidade do método, com o seu reduzido custo, e com um desempenho analítico aceitável na gama de concentrações de interesse para as amostras em causa.

Numa era de elevado cariz tecnológico, torna-se assim essencial o desenvolvimento de um método simples e seletivo, que permita a monitorização de creatinina de uma forma rápida e eficaz. Em alternativa aos métodos ópticos e separativos já descritos, surgem os métodos electroanalíticos.

### **1.3.3. Métodos electroanalíticos**

Os métodos electroanalíticos são métodos instrumentais de análise, assim designados por recorrerem a medidas de uma propriedade de natureza elétrica, como potencial (V) ou corrente ( $I$ ), para determinarem a concentração de um analito. Relativamente a outros métodos instrumentais, as principais vantagens destes métodos são: (a) seletividade e especificidade para um determinado elemento; (b) necessidade de utilização de equipamento pouco dispendioso; (c) possibilidade de obtenção de informação sobre estequiometria e constantes de equilíbrio, velocidade e reversibilidade de reações; (d) e grande sensibilidade com baixos limites de deteção. São várias as técnicas instrumentais no domínio electroanalítico, dependendo da propriedade medida e das condições elétricas durante o ensaio [34].

A potenciometria e a amperometria têm sido as técnicas mais utilizadas no contexto da determinação de creatinina em amostras biológicas, recorrendo invariavelmente a reações enzimáticas acopladas a biossensores [35]. O recurso a reações de anticorpo/antígeno encontra-se também descrito na literatura, mas a deteção é realizada indiretamente, via reação da glucose com a superfície sensora e subsequente monitorização do peróxido de hidrogénio produzido amperometricamente [36]. A deteção indireta de um marcador redox derivado de quinona encontra-se também descrita como meio de monitorização da ligação da creatinina ao seu anticorpo [37]. Um método eletroanalítico mais recente propõe a determinação de creatinina com base no acompanhamento eletroquímico da reação de Jaffe [38], estando por isso associado a todas as desvantagens decorrentes da utilização desta reação.

Uma das técnicas de natureza elétrica ainda por explorar é a deteção potenciométrica direta de creatinina com recurso a materiais biomiméticos, capazes de incorporar o composto alvo numa membrana e de promover variações de potencial úteis do



ponto de vista analítico. Esta técnica é por isso alvo de estudo no presente trabalho e passa a ser descrita de seguida.

#### **1.4. Potenciometria**

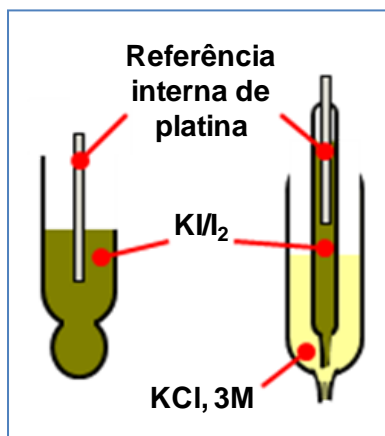
A potenciometria é uma técnica que estabelece relações entre a diferença de potencial de dois elétrodos mergulhados numa solução, em condições de corrente nula, e a atividade de espécies presentes na referida solução. Um dos elétrodos é denominado por eletrodo de referência e deve manter o seu potencial constante; o outro eletrodo é o indicador e deve variar o seu potencial com a concentração do ião alvo, de modo previsível [39]. O contacto elétrico entre os dois elétrodos é garantido através de ponte(s) salina(s).

A aplicação da potenciometria em química analítica é vasta, sendo, sobretudo, de natureza quantitativa. Esta aplicação teve início em 1889 pela equação de Nernst, sendo restrita a elétrodos metálicos em equilíbrio com a sua espécie redox. Quase duas décadas mais tarde, em 1906, Max Cremer detetou a formação de um potencial elétrico na sequência do contacto de dois líquidos de pH diferente em lados opostos de uma mesma membrana de vidro [40]. Pouco depois, Fritz Haber e Zygmunt Klemensiewicz basearam-se no princípio descoberto por Max Cremer, para, em 1909, criarem o primeiro eletrodo de vidro como instrumento analítico [41]. Nos anos 30 surge o primeiro eletrodo comercial de medição de pH, produzido por Arnold Beckman [42,43].

A evolução da eletrónica possibilitou, entretanto, melhorias significativas na amplificação do sinal elétrico emitido pelos equipamentos de medida, com subsequente diminuição do ruído. Este aperfeiçoamento conduziu ao aparecimento de aparelhos de menores dimensões e que apresentavam melhor desempenho [41]. Por volta dos anos sessenta, surge o primeiro aparelho de medição de pH portátil, desenvolvido e produzido pela firma Jenco Electronics e comercializado pela firma Cole-Parmer. Nesta altura, a potenciometria estava presente na maioria dos laboratórios devido à utilização de elétrodos de vidro para monitorizar o pH, e de alguns elétrodos metálicos constituídos por um metal revestido de um dos seus sais. Estes elétrodos eram, no entanto, rudimentares, mostrando diversas debilidades, tais como falta de reprodutibilidade, fraca estabilidade e longos tempos de resposta.

O aparecimento de elétrodos seletivos de ião (ESIs) comercializados na Hungria, por volta de 1965, foi o início desta nova fase de desenvolvimento técnico nesta área. Esses elétrodos eram seletivos a  $\text{Ag}^+$ , a  $\text{Cl}^-$ , a  $\text{Br}^-$  e a  $\text{I}^-$ . Em 1966 surgiu um eletrodo sensível a  $\text{F}^-$

[44]. Esta unidade produziu um grande impacto na época devido à importância da análise deste ião em águas potáveis, às dificuldades associadas ao processo analítico convencional e às ótimas características do eletrodo. No ano seguinte Ross concebeu, pela primeira vez, um eletrodo em que o sensor era um líquido mantido num suporte inerte (Figura 1-4).



**Figura 1-4** Sistema de referência para o eletrodo de pH de "Ross".

A introdução de um novo conceito de membranas seletivas de natureza polimérica foi o passo seguinte nesta evolução. Este conceito foi introduzido por Thomas e Moody, recorrendo a membranas de poli(cloreto de vinilo), PVC, para a imobilização do sistema sensor. Esta modalidade revolucionou o fabrico de eletrodos seletivos de iões de membrana, tornando os ESIs mais fáceis de manusear e apropriados a aplicações clínicas, levando à miniaturização subsequente dos eletrodos enquanto dispositivos sensores.

Nos anos 80, a comunidade médica dispunha já de diversas metodologias de medição de iões, recorrendo a unidades de ESI. De acordo com a Sociedade Americana de Patologistas, o número de ESIs disponíveis nesta década para medições de eletrólitos aumentou substancialmente [45], vindo a substituir os analisadores de fotometria de chama de então. Como se pode verificar na tabela 1-2, em 1980 apenas 15% dos laboratórios usavam ESIs, e em 1985 essa percentagem subiu para cerca de 70% [45].

**Tabela 1-2** Número de laboratórios que utilizavam ESIs e analisadores de fotometria de chama para medições de eletrólitos [45].

Ano	1980	1982	1983	1984	1985
ESIs	1038	2272	3115	3627	4312
Chama	4823	4123	2862	2063	1877

Atualmente estão descritos diversos elétrodos seletivos de iões na literatura que se apresentam em variadas configurações e maioritariamente com membranas poliméricas de condutor móvel.

As principais vantagens dos ESIs em relação às outras técnicas analíticas são: (a) a resposta rápida a variações alargadas de concentração do analito; (b) a elevada estabilidade em amplas gamas de concentrações e ao longo do tempo; (c) o baixo custo de detectores baseados em ESIs e restante equipamento, podendo ser facilmente construídos em laboratório; (d) a ausência interferência de cor ou turvação das amostras; (e) a elevada seletividade; (f) e a grande facilidade de operação, tornando-se por isso ideais para aplicação em análise clínica [46].

#### 1.4.1. Considerações teóricas

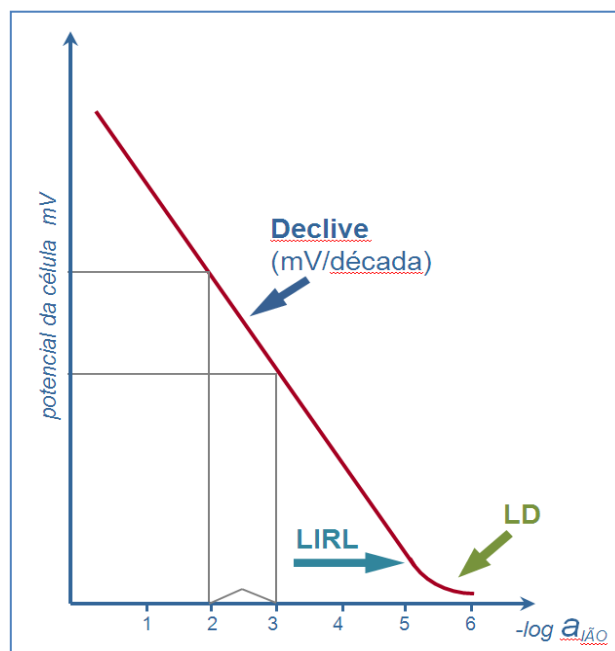
Segundo a definição da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), 1994, um ESI é um sensor eletroquímico, baseado num pequeno filme ou numa membrana seletiva como elemento de reconhecimento. Estes sistemas são distintos de sistemas que envolvam reações de oxidação/redução. O termo *elétrodo específico de iões* não é recomendado, pois nenhum elétrodo é verdadeiramente específico para uma espécie iónica [47]. As diferenças de potencial medidas (potencial ESI *versus* potencial de elétrodo de referência) são linearmente dependentes do logaritmo da atividade de um dado ião em solução, variando de acordo com a equação 1.7,

$$E = \text{"Constante"} + \frac{2,303RT}{Z_A F} \times \log a_A \quad (\text{equação 1.7})$$

em que E: valor experimental de potencial de um ESI; R: constante dos gases perfeitos, 8,3144 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>; T: temperatura termodinâmica, K; F: constante de Faraday, 9,64846x10<sup>4</sup>

$C \text{ mol}^{-1}$ ;  $z_A$ : carga do ião principal;  $a_A$ : atividade do ião principal,  $\text{mol L}^{-1}$  ou  $\text{mol kg}^{-1}$ ; e "constante": inclui o potencial normal do eletrodo seletivo, o potencial do eletrodo de referência e o potencial de junção líquida, mV.

O traçado gráfico da atividade do ião em função da diferença de potencial corresponde à curva de calibração potenciométrica (Figura 1-5). O limite inferior de resposta linear (LIRL), o limite de deteção (LD) e o declive são os três parâmetros mais relevantes de uma curva de calibração [47]. O valor de interceção entre os segmentos que prolongam o comportamento linear e o não linear corresponde ao valor de LD, ao passo que o LIRL é determinado pelo valor de concentração mínimo a partir do qual a resposta potenciométrica típica pode ser considerada um comportamento linear. A sensibilidade da resposta potenciométrica é traduzida pelo seu declive, esperando-se um valor de cerca de  $59.6/z_A \text{ mV década}^{-1}$ , em condições normais de pressão e temperatura.



**Figura 1-5** Características gerais da curva de calibração.

Para que o valor de concentração da espécie possa ser utilizado em detrimento da atividade, é necessário proceder-se ao ajuste da força iónica ( $I$ ) das soluções. O valor de força iónica traduz, de forma simples, a carga iónica global da solução, correspondendo à

medida da intensidade do campo elétrico devido à presença de iões em solução. Esta entidade é calculada pela equação 1.8,

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (\text{equação 1.8})$$

na qual  $c_i$  é a concentração do ião, em  $\text{mol L}^{-1}$ , e  $z_i$  a carga do ião. Do ponto de vista prático, a força iónica das soluções é ajustada com eletrólitos simples, que não contenham o ião principal a medir.

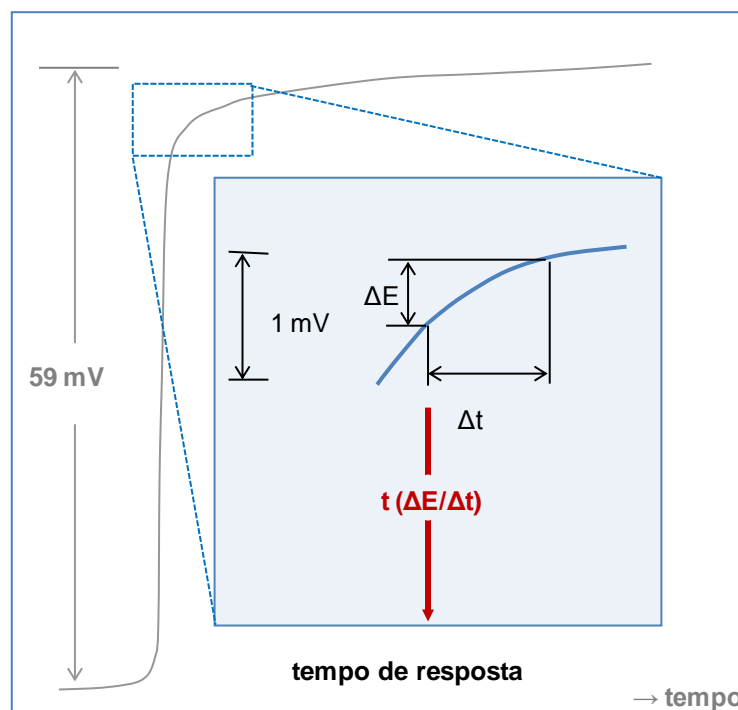
O tempo de resposta é outra propriedade utilizada para avaliar o desempenho de ESIs. Segundo as recomendações da IUPAC, o tempo de resposta de uma célula potenciométrica é o tempo que decorre entre o momento em que os elétrodos indicador e de referência são colocados em contacto com uma solução da amostra (ou na qual se varia a atividade ou concentração de ião principal) e o primeiro momento em que o declive  $\Delta E/\Delta t$  iguala um valor limite previamente estabelecido (Figura 1-6). O valor limite é definido com base em questões de ordem experimental ou na exatidão desejada para a leitura potenciométrica [47].

A seletividade será provavelmente a propriedade analítica mais relevante de um ESI, traduzindo a sua capacidade em distinguir o ião para o qual o ESI é seletivo (A) de outros iões presentes na solução (B). A influência do ião coexistente é traduzida pela sua concentração e pelo coeficiente de seletividade potenciométrica correspondente,  $K^{\text{POT}}_{A,B}$ . Este efeito está patente na equação de Nicolsky-Eisenmam, equação 1.9,

$$E = \text{constante} + \frac{2,303RT}{z_A F} \log \left[ a_A + \sum_{i=1}^n K^{\text{pot}}_{A,B_i} (a_{B_i})^{z_A/z_{B_i}} \right] \quad (\text{equação 1.9})$$

na qual E: valor experimental de potencial de um ESI; R: constante dos gases perfeitos,  $8,3144 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ; T: temperatura termodinâmica, K; F: constante de Faraday,  $9,64846 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$ ;  $a_A$ : atividade do ião principal,  $\text{mol l}^{-1}$  ou  $\text{mol kg}^{-1}$ ;  $a_B$ : atividade de espécie iónica interferente;  $z_A$ : número inteiro de sinal e magnitude da carga do ião principal;  $z_B$ : número inteiro de sinal e magnitude da carga de iões interferentes; “constante”: inclui o potencial normal do eletrodo seletivo, o potencial do eletrodo de referência e o potencial de junção

líquida, mV; e  $K_{A,B}^{POT}$ : coeficiente de seletividade potenciométrica relativamente ao ião interferente [47].



**Figura 1-6** Representação gráfica do tempo de resposta,  $t(\Delta E/\Delta t)$ , de uma célula de eletrodo seletivo de ião, considerando uma espécie iónica de carga +1.

Os coeficientes de seletividade potenciométrica podem ser calculados através de diversos métodos, tais como o método das soluções separadas, o método das soluções mistas e o método *matched potential*. Os valores fornecidos por cada um destes métodos devem ser interpretados como valores simplesmente orientadores do grau de seletividade, uma vez que cada um destes apresenta limitações inerentes à sua base teórica. No geral, os dois primeiros estão subjacentes a erros decorrentes da resposta não *Nernstiana* de um ESI aquando da presença de um interferente [48,49]. O terceiro método não depende da resposta *Nernstiana* e, apesar de ser desprovido de sustentação teórica, será o mais recomendado quando o objetivo é a aplicação prática do dispositivo desenvolvido em condições reais.

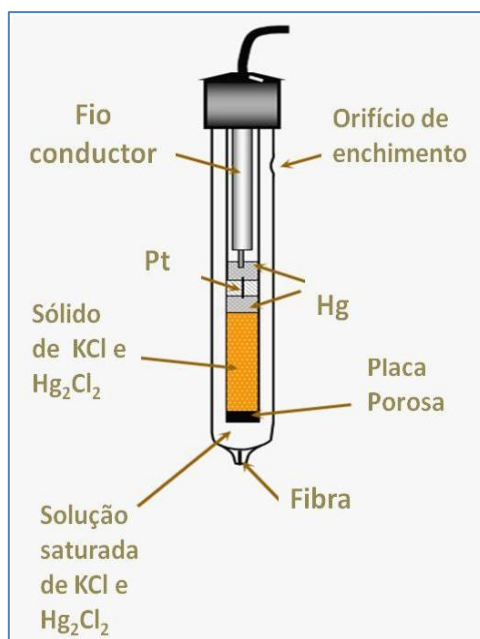
### 1.4.2. Eléctrodo de referência

Um eléctrodo de referência apresenta um potencial virtualmente constante nas condições utilizadas para uma determinada medição eletroquímica, uma vez que o seu potencial é função de uma espécie cuja concentração permanece inalterada durante toda a determinação. Um eléctrodo de referência deve apresentar as seguintes características: (a) potencial eletroquímico estável e bem definido; (b) impedância nula ou próxima de zero; (c) ser de fácil preparação; (d) permitir o ajuste rápido e preciso do potencial; (e) e histerese térmica desprezável, isto é, o potencial do eléctrodo deve responder prontamente a uma variação de temperatura, mas assim que a temperatura inicial for restabelecida, o seu potencial deve voltar ao valor inicial.

O eléctrodo de calomelanos, o de cloreto de prata/prata e o de padrão de hidrogénio representam alguns exemplos de eléctrodos de referência mais representativos [47].

#### 1.4.2.1. Eléctrodo de calomelanos

O eléctrodo de calomelanos é constituído por um fio de platina em contacto com calomelano (cloreto de mercúrio I) e uma solução de cloreto de potássio de concentração conhecida, apresentando uma configuração típica análoga à apresentada na Figura 1-7.



**Figura 1-7** Eléctrodo de calomelanos.

Tipicamente, a solução de calomelano pode ser de concentração igual a 0,1 ou a 1,0 mol L<sup>-1</sup> ou saturada. Dependendo da concentração usada, o eléctrodo pode ser designado por eléctrodo de calomelano decimolar, eléctrodo de calomelano molar ou eléctrodo de calomelano saturado. O eléctrodo de calomelano saturado é dos três o mais usado, mas apresenta a desvantagem do seu potencial variar com a alteração da temperatura, algo que é menos evidente para os eléctrodos com concentrações de calomelano inferiores.

Os eléctrodos de calomelano foram amplamente utilizados em medidas potenciométricas associadas a medidores de pH ou a medidores seletivos de iões [50]. No entanto, estes eléctrodos foram hoje genericamente substituídos por outros igualmente estáveis e menos tóxicos do ponto de vista ambiental, como é o caso dos eléctrodos de prata/cloreto de prata.

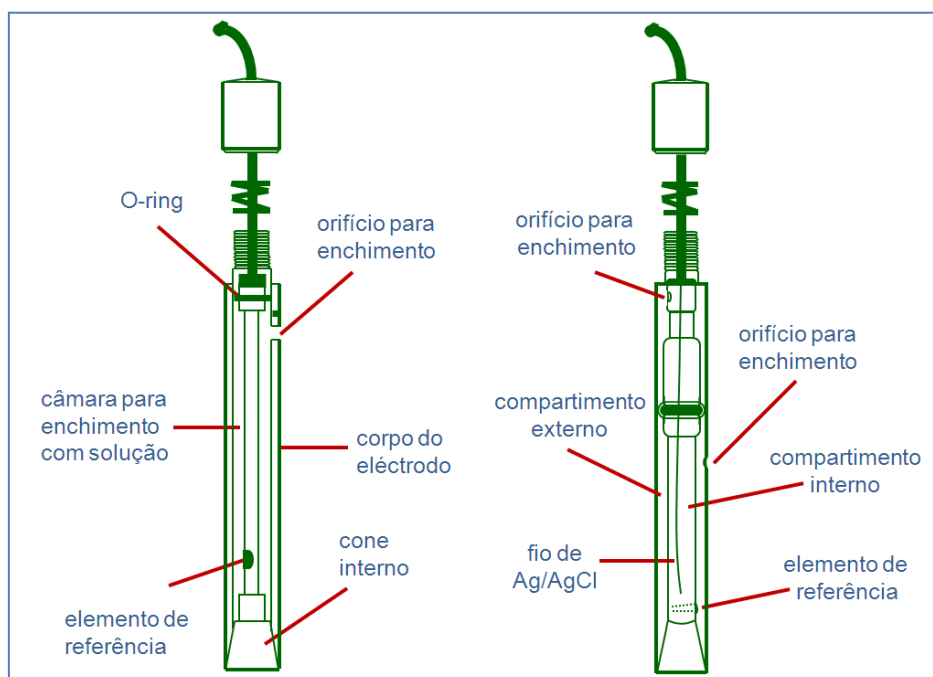
#### **1.4.2.2. Eléctrodo de prata/cloreto de prata**

O eléctrodo de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) é o eléctrodo de referência de eleição para muitas análises eletroquímicas, uma vez que, é fácil de preparar, bastante estável e robusto e de custo reduzido. Será seguramente o eléctrodo de referência mais utilizado a nível mundial atualmente.

Este eléctrodo é constituído por um fio de prata, com um revestimento eletrolítico de uma fina camada de cloreto de prata, que se encontra mergulhado, geralmente, numa solução de cloreto de potássio, com concentração conhecida, saturada por cloreto de prata (Figura 1-8).

Neste eléctrodo o potencial depende diretamente da concentração de cloreto presente nesta solução, pelo que esta solução deve ser preservada de qualquer contaminação externa. Para este efeito, o compartimento que contém esta solução é rodeado por um compartimento externo, que previne qualquer difusão de iões exteriores para esta solução. A ligação eléctrica entre estes compartimentos e a solução de medida é assegurada através de junções iónicas, constituídas com base em pontes salinas. Estes eléctrodos são, por isso, habitualmente designados por eléctrodos de dupla junção.



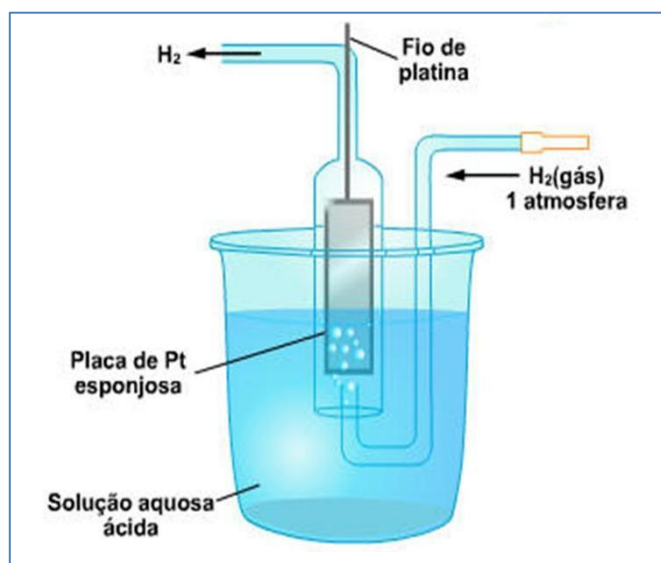


**Figura 1-8** Esquema representativo de um eletrodo de prata/cloreto de prata de dupla junção.

#### 1.4.2.3. Eletrodo padrão de hidrogénio

O eletrodo de hidrogénio é utilizado como referência universal para os potenciais de eletrodo, podendo ser considerado como eletrodo de referência primário ou padrão. Este eletrodo é composto por um fio de platina no interior de um tubo, no qual o hidrogénio penetra por uma entrada lateral, escapando no fundo através da solução em estudo (Figura 1-9). Em contacto com a solução teste encontra-se uma folha metálica de platina, ficando parte desta permanentemente imersa na solução, para evitar a interrupção da corrente elétrica.

O uso de um eletrodo padrão de hidrogénio, como eletrodo de referência é impraticável em análises de rotina, uma vez que possui diversas especificidades não compatíveis com uma rotina normal de trabalho laboratorial. O facto de o mesmo não poder ser usado na presença de agentes oxidantes ou redutores e de necessitar da alimentação de uma corrente de hidrogénio puro a uma determinada pressão, são algumas das condicionantes para o uso deste eletrodo como referência no dia-a-dia.



**Figura 1-9** Esquema de um eletrodo padrão de hidrogénio [51].

A utilização de outros eletrodos de referência, mais baratos e que já se encontram montados, ficando, assim, disponíveis para o uso imediato, apresenta-se como uma solução mais viável quando comparamos com este eletrodo [50], sendo de facto o eletrodo de prata/cloreto de prata aquele de uso mais corrente.

### 1.4.3. Eletrodo indicador

Tal como referido anteriormente, o potencial de um eletrodo indicador varia de acordo com variações de concentração da espécie iónica a ser determinada e para a qual o eletrodo indicar é seletivo. Entre outros requisitos mais específicos, um eletrodo indicador deve apresentar (a) elevada sensibilidade à espécie a ser determinada; (b) elevado grau de reprodutibilidade; (c) e resposta rápida à variação de concentração da espécie em estudo. Existem diferentes tipos de eletrodos indicadores, que podem ser divididos genericamente em dois grupos: os eletrodos metálicos e os ESI [50].

#### 1.4.3.1. Eletrodos metálicos

Os eletrodos metálicos são aqueles que originam resposta potenciométrica face à presença de um metal, podendo estar ou não na presença da sua espécie oxidada. Estes eletrodos são, por sua vez, divididos em quatro grupos diferentes: os eletrodos inertes, os eletrodos de primeira espécie, os eletrodos de segunda espécie os eletrodos de terceira espécie.

Nos elétrodos inertes, tal como o nome indica, existe um metal inerte imerso numa solução aquosa, onde o metal serve apenas para facilitar uma troca reversível de eletrões através da sua superfície com os eletrólitos da solução e por isso não estão sujeitos a reações de oxidação ou redução.

Os elétrodos de primeira espécie são constituídos por um metal mergulhado numa solução contendo iões da mesma espécie do metal onde ocorrem trocas reversíveis de iões dessa espécie. Na prática, apenas a prata e o mercúrio se classificam como elétrodos de primeira espécie, pois são capazes de funcionar como elétrodos indicadores dos seus próprios iões exibindo características reversíveis e Nernstianas.

Os elétrodos de segunda espécie são compostos por um metal revestido por um sal pouco solúvel ou por um complexo deste metal imerso numa solução contendo o ião que forma o sal ou o complexo. Estes elétrodos são utilizados para medir a atividade do anião com o qual o catião de um outro metal forma precipitado ou complexo.

Por último, os elétrodos de terceira espécie são constituídos por um metal em contacto com um sal pouco solúvel do próprio metal e por um sal menos solúvel de um segundo metal, com os dois sais envolvendo um ião comum [50]. Caracterizam-se por apresentarem uma baixa seletividade, já que se o potencial gerado depende de um conjunto de reações químicas.

De uma forma geral, os elétrodos metálicos não são utilizados hoje em dia na qualidade de elétrodos indicadores, mas sim como elétrodos de referência. Tal como referido anteriormente, a sua configuração nesta condição apresenta-se habitualmente com uma dupla junção, já que nesta o contacto do metal e da sua espécie oxidada é limitado à sua solução de referência interna. A ausência de qualquer contacto íntimo deste conjunto com a solução de medida assegura a manutenção de um potencial estável ao longo das medidas potenciométricas, um requisito essencial para um eléctrodo de referência.

#### **1.4.3.2. Elétrodos seletivos de ião**

Os ESI são elétrodos que apresentam uma membrana seletiva que confere ao dispositivo uma elevada seletividade de resposta para um dado ião. Na interface membrana do eléctrodo/solução é estabelecido um potencial estável, que quando combinado com um eléctrodo de referência constitui uma célula eletroquímica funcional.

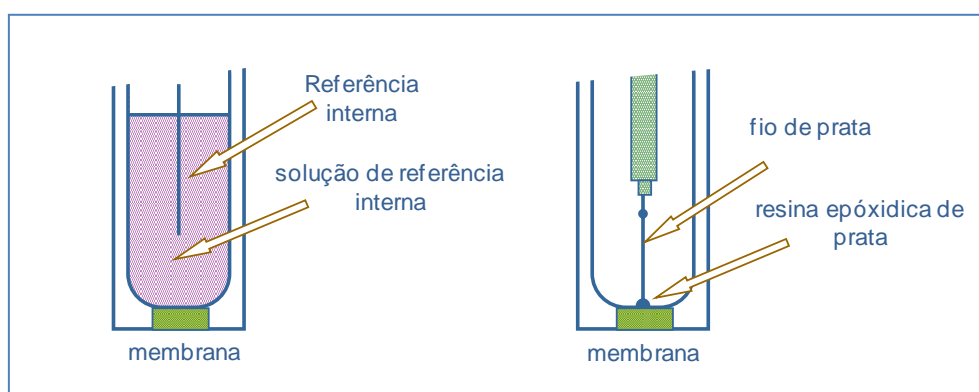
Tipicamente, as membranas seletivas incorporam o ião a medir por reações de complexação, cristalização ou permuta iónica, e devem ter baixa solubilidade aquosa, uma

vez que se encontram em contacto direto com a solução, baixa condutividade elétrica e permitir reações seletivas para com o analíto. Do ponto de vista físico, os elétrodos de membrana podem apresentar-se com membranas de natureza cristalina e ou não cristalina [47].

#### 1.4.3.2.1. Elétrodos de membrana cristalina

Os elétrodos cristalinos são compostos por material eletroquímico responsável pela resposta do elétrodo com iões móveis carregados por uma carga e uma estrutura fixa de carga oposta. As membranas existentes nestes elétrodos designam-se por homogéneas, quando a mesma é constituída por um único componente, ou heterogéneas, quando a substância ativa ou a mistura de substância ativas é incorporada numa matriz inerte [47]. Do ponto de vista prático, estas membranas estabelecem um potencial interno através de uma solução de referência interna ou através de um contacto metálico sólido (Figura 1-10).

A dificuldade de utilização destas membranas em condições reais prende-se com a existência de um conjunto limitado de compostos que pode ser utilizado na sua preparação, tendo em vista garantir a sua estabilidade física por períodos longos de utilização. Os elétrodos mais usados são efetivamente os de membrana não cristalina.

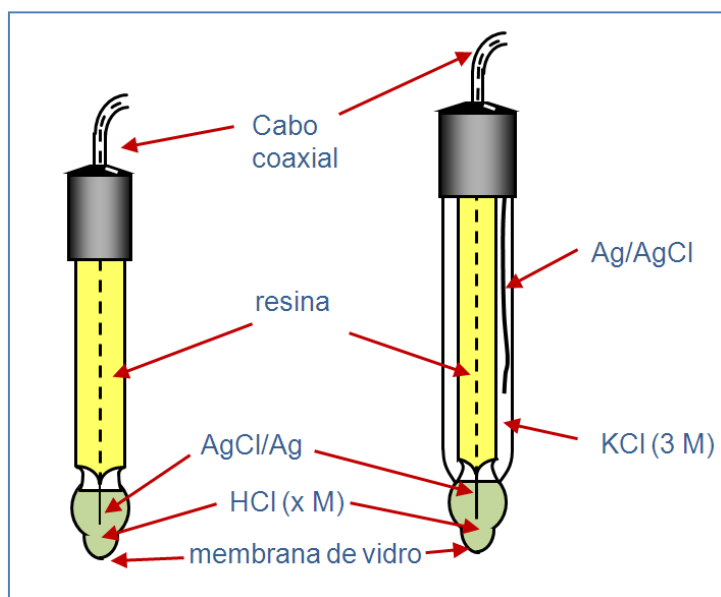


**Figura 1-10** Representação esquemática de ESIs com membrana cristalina, com solução de referência interna (esquerda) ou sem solução de referência interna (direita).

#### 1.4.3.2.2. Eléktrodo de membrana não cristalina

Os ESIs não cristalinos utilizam membranas com uma estrutura suporte ao sistema sensor. A estrutura desta membrana pode ser porosa ou não porosa, podendo apresentar-se segundo uma estrutura rígida (como o vidro) ou com locais móveis de iões carregados positivamente ou negativamente ou de espécies sem qualquer carga [47].

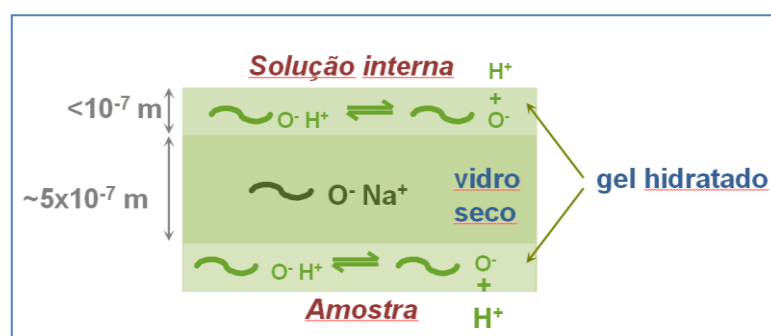
Um dos eléctrodos seletivos mais utilizado é o eléctrodo de vidro, normalmente designado por eléctrodo de pH (Figura 1-11). Este eléctrodo possui uma membrana não cristalina de matriz rígida e fornece informações sobre os cations  $H^+$  presentes na solução ensaiada. A membrana de vidro é composta tipicamente por dióxido de silício com óxidos de metais alcalinos e a sua natureza é um fator muito importante, que condiciona a espécie iónica permutada preferencialmente com a solução [40].



**Figura 1-11** Representação esquemática de ESI de membrana de vidro simples (esquerda) ou combinado (direita), seletivo a  $H^+$ .

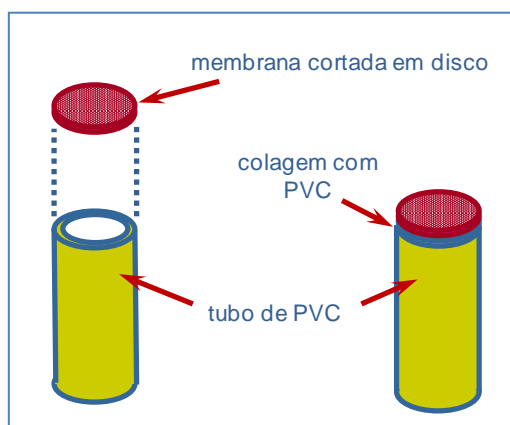
De uma forma geral, quando se mergulha um eléctrodo de vidro numa solução, a secção externa da membrana seletiva que contém encontra-se hidratada (Figura 1-12). Nesta secção, é possível observar fenómenos de permuta iónica, tipicamente entre a espécie  $H^+$  proveniente do meio externo e a que se encontra já nessa secção de vidro hidratado, até que se atinja um equilíbrio dinâmico. Na sequência desta permuta estabelece-

se um potencial de membrana externo que é condicionado pela concentração de  $H^+$  em solução externa, fornecendo assim informação sobre o seu valor de pH. O potencial interno desta membrana é constante, uma vez que a solução com que contacta é a solução de referência interna, que se apresenta com um valor de pH constante. Estes eléctrodos são comercializados muitas vezes na forma de eléctrodo de vidro combinado, que contém internamente um eléctrodo de referência, obviando a necessidade da presença física de dois eléctrodos para constituir uma célula eletroquímica.



**Figura 1-12** Representação esquemática do corte transversal de uma membrana de vidro constituída por silicatos e sua permuta com  $H^+$  do meio externo ou interno.

As membranas não cristalinas apresentam-se com uma consistência de borracha e são coladas tipicamente no topo de tubos cilíndricos, para que sirvam de suporte à sua imersão na solução aquosa (Figura 1-13). Tal com as membranas rígidas, estas membranas podem apresentar uma referência interna de natureza líquida, com solução de referência interna, ou de natureza sólida, através de um contacto metálico condutor.



**Figura 1-13** ESI de membrana não cristalina, de natureza polimérica, e sua ligação a um tubo cilíndrico que funciona como corpo do eletrodo.

Estas membranas são constituídas por um permutador, um solvente mediador e uma matriz polimérica. O permutador é o material eletroquímico responsável pela permuta do ião principal entre a membrana e a solução aquosa a analisar e pode apresentar carga positiva, negativa ou ser neutro. O solvente mediador deve possuir baixa solubilidade em água, elevada viscosidade e estabilidade à luz, devendo ainda constituir um meio favorável à permuta do ião desejado. A matriz de incorporação é baseada em polímeros como borracha de silicone ou PVC, que devem conferir, no essencial, propriedades de borracha ao material de suporte, conferindo-lhe, assim, um meio favorável à permuta iónica.

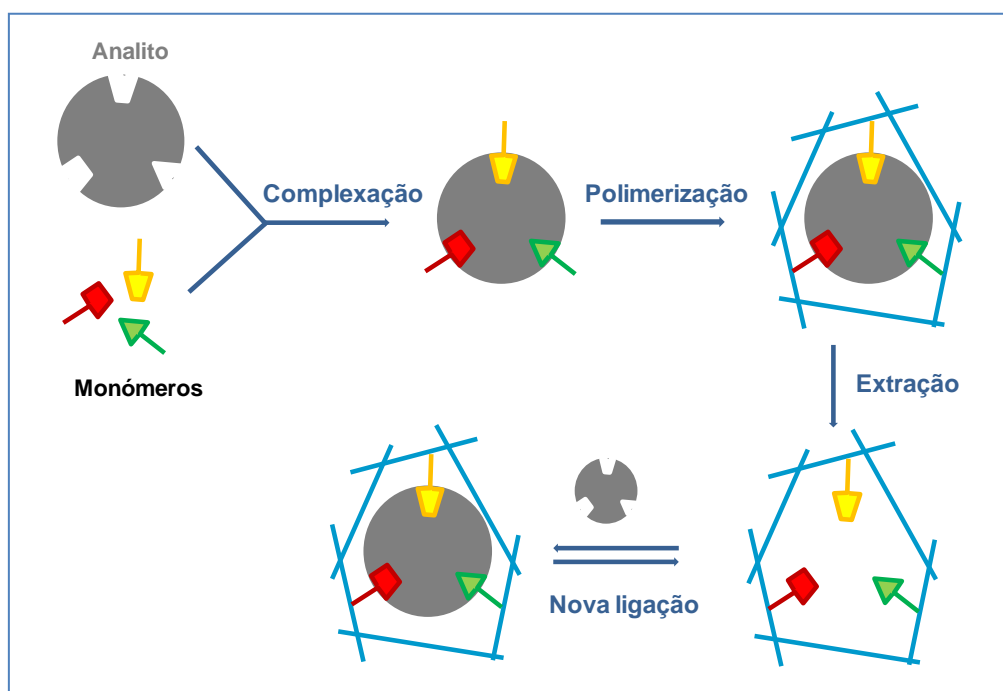
De uma forma geral, quanto maior a afinidade do ião a analisar para o sistema sensor constituído, melhores são as características de seletividade do eletrodo seletivo obtido. Esta afinidade está usualmente relacionada com ligações de natureza electrostática, podendo depender ou não de características estereo-específicas de interação entre o ião em estudo e o permutador.

No que diz respeito à creatinina, não existe descrito na literatura nenhum eletrodo seletivo para esta espécie iónica, pelo que não é possível identificar as características físico-químicas do permutador que pudessem ser as mais adequadas para a preparação destes dispositivos. No entanto, tendo em conta a experiência científica do grupo que acolhe o presente trabalho, pensa-se que o desenvolvimento de um material biomimético para a creatinina, que permita interações electrostáticas com a molécula alvo e que também possa condicionar a sua ligação a questões espaciais, poderá favorecer as características de resposta do dispositivo. Para este efeito, passa-se a descrever sumariamente a preparação de materiais de impressão molecular, tendo em vista a sua aplicação enquanto permutador em membranas seletivas.

### 1.5. Polímeros de Impressão Molecular

Frank Dickey introduziu o conceito de impressão molecular, por volta de 1949, ao demonstrar que materiais puramente sintéticos poderiam reter a memória de uma molécula. Este conceito foi utilizado para produzir uma estrutura rígida tridimensional (um polímero) em torno de uma molécula (molde), de forma a ser possível efetuar o reconhecimento dessa mesma molécula. Estes polímeros são atualmente conhecidos como MIP (do inglês, "Molecularly Imprinted Polymers") [52]. Por outras palavras, a tecnologia de impressão molecular é capaz de produzir polímeros providos de sítios específicos de reconhecimento, estereoquimicamente moldados a partir de uma molécula modelo [53].

A síntese de materiais MIP inicia-se pela formação de um complexo entre os monómeros funcionais e a molécula modelo (Figura 1-14). De uma forma geral, os grupos funcionais dos monómeros são posicionados de forma complementar aos seus pontos de interação com a molécula modelo, permitindo a formação de um complexo entre ambos [53]. Neste sentido, é essencial que o analito contenha na sua estrutura molecular grupos funcionais capazes de interagir com os monómeros, para que seja possível formar um complexo estável entre ambos.



**Figura 1-14** Esquema exemplificativo da síntese de polímeros de impressão molecular, com destaque para as suas quatro fases principais.



A interação de complexação do analíto com o monómero pode acontecer através de uma ligação covalente ou não covalente, por meio de ligação de hidrogénio, por interação dipolo/dipolo, por interação iónica ou por interação hidrofóbica. Os polímeros que apresentam locais de interação mais seletivos são aqueles resultantes de ligações covalentes, dada a uniformidade gerada nos mesmos. Todavia, a necessidade do uso de monómeros e de analítos específicos para que estabeleçam ligações covalentes limita a aplicabilidade dos MIP a poucas espécies. Além disso, estes polímeros apresentam uma cinética lenta de retenção dos analítos na cavidade do polímero. Os polímeros preparados a partir de ligações não covalentes apresentam, contrariamente, uma maior flexibilidade de aplicação dos MIP para diferentes analítos, apresentando no entanto diâmetros de partículas e locais seletivos menos uniformes.

A escolha dos monómeros utilizados nesta fase de complexação é feita com base na natureza do analíto. Por exemplo, monómeros com carácter básico, como o 4-vinilpiridina (VP), interagem preferencialmente com analítos que contenham grupos ácidos; por outro lado, monómeros que contenham grupos ácidos, como o ácido metacrílico (MAA) interagem mais facilmente com analítos que contenham grupos básicos [54,55]. No essencial, é fundamental a presença de uma complementaridade electrostática entre os grupos funcionais dos monómeros e os grupos presentes na molécula alvo de impressão.

As características morfológicas dos materiais MIP obtidos podem também ser influenciadas pelo solvente utilizado durante o processo de complexação. Alguns estudos indicam que os solventes com características apolares e com baixa constante dielétrica são os mais indicados para a síntese de MIPs, baseados em interações com ligação de hidrogénio [54].

A fase seguinte de preparação de materiais MIP consiste na polimerização desses monómeros na presença de um agente de reticulação e de um iniciador capaz de desencadear a reação polimérica. Neste caso, a escolha do iniciador pode ser crucial, dependendo do tipo de interação electrostática presente. Por exemplo, se a interação foi feita através de ligação de hidrogénio, a polimerização deve ser efetuada a temperaturas baixas e, nestas circunstâncias, os iniciadores radicalares ativos serão os mais indicados. O agente de reticulação é também de especial relevância, uma vez que as características de reticulação do polímero obtido dependem essencialmente deste constituinte. O etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) é um dos reagentes de ligação cruzada mais utilizado, pois promove

a formação de polímeros com elevada estabilidade térmica e mecânica e que permitem rápida transferência de massa [54].

A terceira fase de preparação dos materiais MIP consiste na remoção da molécula aprisionada na matriz polimérica. A remoção da molécula impressa é habitualmente estabelecida com base na lavagem dos materiais num solvente adequado. Este solvente deve funcionar como um meio onde o analito e os monómeros sejam solúveis, não devendo afetar a matriz polimérica já formada.

A saída da molécula impressa permite criar sítios de ligação que são complementares em tamanho e forma ao modelo molecular utilizado no processo. Transmite-se, desta forma, ao polímero sintético essa memória molecular referida anteriormente [55]. É espectável nesta fase que o contacto do material MIP com a sua molécula alvo permita uma nova ligação destas moléculas aos locais onde se encontravam na fase de polimerização.

É possível encontrar na literatura diversos materiais MIP desenhados para creatinina (tabela 1-3). Este processo teve início em 1997, mas sofreu uma grande expansão sobretudo nos últimos anos. De uma forma geral, os materiais MIP produzidos são utilizados para a ligação à creatinina, tendo em vista a separação cromatográfica de amostras reais ou a sua ligação diferenciada à molécula alvo quando na presença dessas amostras. Neste último caso, os materiais descritos são geralmente testados no que diz respeito à sua capacidade de ligação, não sendo aplicados à análise de amostras reais.

**Tabela 1-3** Descrição sumária dos processos de síntese de MIPs de creatinina.

Monómero	Agente de reticulação	Aplicação	Características	Ref.
MAA	Divinilbenzeno	Empacotamento de coluna cromatográfica	Precipitação modificada	[56]
Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico Ácido itacónico Ácido metacrílico	<i>N,N'</i> -metilenbisacrilamida	Recobrimento de material polimérico para deteção local	Foto-iniciada	[57]
MAA	divinilbenzeno	Empacotamento de coluna cromatográfica	Precipitação modificada	[58]
(Sol-gel)	Tetraethoxisilano	—	Adição de $Al^{3+}$ para gerar centros de ácidos de Lewis	[55]
Poli(MAA)	etileno glicol diglicidil éter	—	Partículas de sílica polimerizadas com MAA e depois complexadas com creatinina e reticuladas.	[59]
$\beta$ -ciclodextrina VP	Divinilbenzeno Epilclorohidrina	—	Escolhido o MAA com Divinilbenzeno	[60]
$\beta$ -ciclodextrina	Epilclorohidrina	—	—	[61]
complexos zinc(II)cycleno	EGDMA	—	—	[62]

### 1.6. Polímeros de Impressão Molecular na potenciometria

É hoje certo que os materiais MIP podem ser utilizados na preparação de sistemas sensores potenciométricos, substituindo com vantagem o permutador convencional em membranas seletivas de natureza polimérica. Além disso, a associação dos MIP aos sensores potenciométricos pode traduzir-se numa vantagem analítica, esperando-se aqui melhores características gerais de resposta, entre as quais seletividade, sensibilidade e limite de deteção [59].

Considerando que esta associação não foi proposta até à data na literatura, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de materiais MIP para a creatinina e a sua incorporação em membranas seletivas de PVC. Para este efeito, propõe-se o recurso aos materiais convencionais de preparação de MIPs, MAA, VP e EGDMA, uma vez que estes já demonstraram ter sucesso neste processo mas nunca foram utilizados conjuntamente.

Estes materiais são posteriormente incorporados em membranas de PVC, que podem conter ou não um aditivo iónico lipófilo. Este aditivo é utilizado tendo em vista assegurar a seletividade iónica da membrana, caso o próprio polímero obtido não apresente com carga no interior da membrana.

## 2. Descrição Experimental

O trabalho desenvolvido teve início na construção e caracterização de elétrodos seletivos a creatinina. Os materiais, os equipamentos e as metodologias envolvidas na construção, na avaliação e na aplicação dos elétrodos serão apresentados ao longo deste capítulo.

### 2.1. Material e aparelhos utilizados

Todas as soluções foram preparadas em balões volumétricos de classe A, com capacidades de 25,00 a 1000,00 mL. Para as medições de volumes rigorosos iguais ou superiores a 5,00 mL foram usadas pipetas volumétricas de vidro, classe A. Para volumes inferiores recorreu-se a pipetas automáticas VWR®, com capacidades diferentes, de volume regulável. As pesagens foram realizadas numa balança Kern RADWAG modelo XA 110/X, com precisão igual a 0,00001g. Sempre que era necessário promover a dissolução de substâncias sólidas, numa tentativa de reduzir o tempo envolvido nesse processo, foi usado um banho de ultrassons termostatzado, da marca Bandelin.

As diferenças de potencial entre o eléctrodo indicador e o eléctrodo de referência foram medidas com um decimilivoltímetro Crison, GLP 21 (sensibilidade  $\pm 0,1$  mV), representado na Figura 2-1. As medidas de espectroscopia de Raman com microscopia confocal foram realizadas num Thermo Scientific, DXR, enquanto as medidas de espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas num Thermo Scientific Smart iTR Nicolet iS10, acoplado com um acessório de reflectância difusa atenuada (ATR).



**Figura 2-1** Potenciómetro, marca Crison, modelo GLP 21, com suporte de agitação magnética lateral e suporte de dois elétrodos de formato convencional.

## **2.2. Reagentes**

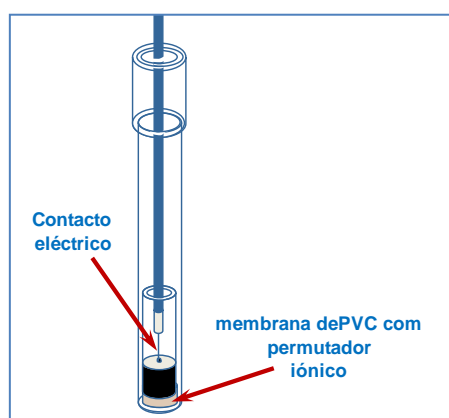
Foram vários os reagentes utilizados ao longo deste trabalho, tendo sido obtidos a partir de várias fontes comerciais. A creatinina, o Tetrakis(4-clorofenil) borato (TpClFB), o *o*-nitrofeniloctil éter (oNFOE), o PVC de alto peso molecular e o EGDMA foram produzidos pela Fluka; o acetonitrilo pela Scharlau; a VP, o ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES), e o MAA pela Alfa Aesar; o peróxido de benzoílo (BPO) pela Himedia; o metanol pela Carlo Erba; o tetrahidrofurano (THF), o ácido ascórbico, o cloreto de potássio pela Riedel-deHaen; e o brometo de tetraoctilamónio (BrTOA) pela Acros; o ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico(HEPES) foi produzido pela Sigma, o ácido Piperazino-*N,N'*-bis(2-etanosulfónico) (PIPES) pela Severn Biotech; a ureia pela Fagron; a carnitina e o cloreto de cálcio dihidratado foram produzidos pela Merk; a glucose pela Fisher Bioreagents, a albumina pela Amresco; e, finalmente, o cloreto de sódio e o sulfato de magnésio foram comercializados pela Panreac.

A água utilizada para a preparação das soluções aquosas foi de qualidade ultrapura, com uma condutividade igual ou inferior a  $0,054 \mu\text{S cm}^{-1}$ , a  $25^{\circ}\text{C}$ . As soluções aquosas mais

concentradas foram preparadas por pesagem rigorosa dos sólidos correspondentes e posterior diluição em tampão.

### **2.3. Construção dos elétrodos**

Os corpos dos elétrodos já se encontravam previamente preparados e continham tubos Perspex<sup>®</sup> como base de suporte à sua estrutura (Figura 2-2). Na extremidade desta foi adaptada uma placa de cobre de, aproximadamente, 0,25 mm de espessura e 7 mm de diâmetro à qual foi soldado um fio interno de um cabo elétrodo coaxial blindado. Este conjunto foi introduzido no interior do corpo do elétrodo, assegurando que a placa de cobre ficaria retida (presa) na estrutura. De forma a conferir maior robustez a esta configuração, fixou-se o cabo blindado à extremidade superior do corpo do elétrodo, com cola Perspex<sup>®</sup> preparada pela dissolução deste polímero em clorofórmio. A cavidade do corpo elétrico deixada sobre a placa de cobre foi preenchida com uma mistura condutora, constituída por araldite, endurecedor e grafite em pó de granulometria inferior a 50  $\mu\text{m}$ . A mistura condutora foi aplicada sobre a placa de cobre formando uma camada de cerca de 7 mm de espessura. Tendo em vista a aplicação posterior de um filme de membrana sensora no elétrodo, a superfície condutora de grafite foi desgastada e alisada, até ao aparecimento de uma cavidade com cerca de 1 a 2 mm de profundidade.



**Figura 2-2** Corpos dos ESI, baseado num tubo de Perspex<sup>®</sup> atravessado por um fio elétrico preso a uma matriz condutora de grafite e na qual foi aplicada a membrana seletiva.

## **2.4. Preparação do sensor**

Para a preparação dos MIP, a molécula molde (creatinina, 0,5 mmol) foi colocada num frasco de vidro (14,0 mm d.i.) juntamente com o monómero funcional (MAA ou VP, 2,5 mmol), o agente de ligação cruzada (EGDMA, 10,0 mmol) e o iniciador (BPO, 0,32 mmol). A mistura foi dissolvida em 3,5 ml de acetonitrilo que atuou como solvente porogénico. A mistura de polimerização foi dissolvida num banho de ultrassons termostatizado, desgaseificada com nitrogénio durante 10 minutos e aquecida a 70 °C durante cerca de 2 horas. Foi ainda preparado, de modo análogo, um polímero sem impressão molecular (do inglês, *non-imprinted polymer*, NIP), excluindo a molécula molde do procedimento.

Os polímeros obtidos foram posteriormente triturados e lavados com acetonitrilo/ácido acético (5:1 v/v), até extração extensa do analíto. A validação da lavagem do material foi feita por análise comparativa de espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR – do inglês “Fourier transform infrared spectroscopy”) da solução sobrenadante das diferentes lavagens em FTIR/ATR, de uma solução pura de acetonitrilo/ácido acético (5:1 v/v) e de uma solução de acetonitrilo/ácido acético (5:1 v/v) contendo creatinina com uma concentração 0,001 mol L<sup>-1</sup>.

Todos os polímeros (MIP/MAA, NIP/MAA, MIP/VP, NIP/VP) foram secos à temperatura ambiente, num exsiccador com atmosfera de azoto, até obtenção de peso seco constante (+/- 0,001 g).

## **2.5. Análise da superfície dos MIPs preparados**

A análise de superfície dos materiais obtidos, MIP/NIP e VP/MAA, foi efetuada por análise direta desses materiais em espectroscopia de Raman com microscopia confocal e em FTIR/ATR. O espectrómetro de Raman foi utilizado com uma lente de 10x, um laser de 532 nm com uma potência de 5mW, e uma abertura de *pinhole* de 50 µm. Os espectros foram traçados para todos os materiais, antes e após a remoção da creatinina.

## **2.6. Preparação das membranas**

De uma forma geral, as membranas sensoras foram obtidas por mistura de 210 mg de PVC, 350 mg de solvente mediador (NFOE), 15 mg de material sensor MIP/MAA (ESIs I, III e IV), NIP/MAA (ESI II), MIP/VP (ESI V, VII e VIII) ou NIP/VP (ESI VI). Os ESIs III e VII



apresentaram ainda 3 mg BrTOA como aditivo catiónico e os ESIs IV e VII continham 3 mg de TpClFB como aditivo aniónico. Para controlo foram ainda construídas três membranas constituídas sem qualquer material sensor ou aditivo (IX), apenas com aditivo aniónico (X) ou catiónico (XI). A composição em massa relativa destas membranas encontra-se indicada na tabela 2-1.

**Tabela 2-1** Composição (em g) das membranas seletivas relativas a cada ESI construído.

Constituinte	MAA				VP				Controlos		
	ISE I	ISE II	ISE III	ISE IV	ISE V	ISE VI	ISE VII	ISE VIII	ISE IX	ISE X	ISE XI
MIP, g	0,015	—	0,015	0,015	0,015	—	0,015	0,015	—	—	—
NIP, g	—	0,015	—	—	—	0,015	—	—	—	—	—
BrTOA, g	—	—	0,003	—	—	—	0,003	—	—	—	0,003
TpClFB, g	—	—	—	0,003	—	—	—	0,003	—	0,003	—
NFOE, g	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
PVC, g	0,21	0,21	0,21	0,213	0,21	0,21	0,21	0,213	0,21	0,21	0,21

Cada uma das misturas anteriores foi adicionada de 3,5 mL de THF e agitada até dissolução completa do PVC presente. As membranas preparadas foram posteriormente aplicadas sobre o suporte condutor de grafite. Cada uma das aplicações foi efetuada após secagem do volume aplicado anteriormente. Na Figura 2-3 encontra-se uma fotografia dos elétrodos assim obtidos, com destaque para a visão lateral das membranas aplicadas nos corpos dos elétrodos.



**Figura 2-3** Elérodos seletivos de creatinina construídos por aplicação da membrana seletiva na extremidade de um tubo de Perspex®, onde se encontrava um suporte condutor sólido à base de grafite.

Uma vez terminada a deposição, as membranas foram secas à temperatura ambiente, durante 24h, e posteriormente condicionadas em solução  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de creatinina.

## **2.7. Avaliação comparativa dos eléctrodos**

A avaliação comparativa dos eléctrodos foi realizada por comparação de curvas de calibração traçadas em meios de constituição e pH diferentes, e pela determinação de coeficientes de seletividade potenciométrica relativamente a espécies iónicas possivelmente interferentes ou expectavelmente presentes na urina ou no soro.

Todas as medidas potenciométricas foram realizadas à temperatura ambiente. Os valores de potencial de cada eléctrodo (ou mais precisamente de força eletromotriz da célula, f.e.m.) foram medidos a um valor constante de pH e de força iónica. As concentrações crescentes de creatinina foram obtidas por transferência de várias alíquotas de solução aquosa de creatinina  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , para um goblé de 100 mL, contendo 50,0 mL de  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de diferentes soluções tampão (HEPES, PIPES e MES).

As curvas de calibração foram traçadas com base nos valores obtidos experimentalmente e de acordo com as recomendações da IUPAC [47]. O LIRL, o LD e o declive foram calculados a partir de, pelo menos, três curvas de calibração consecutivas ou intercaladas, exceto no caso da solução tampão HEPES com pH 7,4, onde apenas foram realizadas duas calibrações. A reprodutibilidade dos sinais analíticos foi obtida a partir do

desvio padrão relativo (em %) do declive obtido em curvas de calibração realizadas nas mesmas condições experimentais.

### 2.7.1. Estudo da influência do pH

Este estudo teve por objetivo verificar qual a influência do pH no traçado das curvas de calibração e a composição do meio utilizado para fixar este parâmetro. Para este efeito, foram traçadas várias curvas de calibração em solução tampão HEPES, com valores de pH compreendidos entre 7,4 e 2,5 unidades. Estas variações de pH foram obtidas por adição de pequenos volumes de uma solução de NaOH saturada ou de HCl concentrado, a uma solução tampão de HEPES. Tendo como base um valor de pH comum, igual a ~2,8, foram ainda traçadas curvas de calibração em solução tampão MES e em solução tampão PIPES. Seguidamente preparou-se a solução de creatinina em cada uma das soluções tampão anteriormente preparadas. A homogeneização da solução, cujo pH foi modificado, foi garantida com o auxílio de um agitador magnético.

### 2.7.2. Avaliação da seletividade dos eletrodos

O cálculo dos valores de coeficiente de seletividade potenciométrica,  $K^{\text{POT}}_{A,B}$ , para os eletrodos que apresentavam um desempenho analítico razoável (ESIs IV, VIII e X) foi efetuado através do método *matched potential*.

Neste estudo, a concentração de creatinina inicial foi igual a  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e a final igual a  $7,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . O salto de f.e.m. observado foi cerca de 30 mV. O efeito da espécie interferente foi avaliado por adição de pequenos volumes de uma solução concentrada dessa espécie a uma solução de creatinina com uma concentração também igual a  $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . A solução de interferente foi adicionada numa quantidade necessária para promover um aumento de 30 mV relativamente ao valor de f.e.m. inicial ou até ao volume máximo de 10% do volume inicial do ensaio (momento a partir do qual não foi possível ignorar a alteração decorrente da concentração inicial de creatinina).

As espécies iónicas utilizadas neste estudo foram a ureia ( $3,3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ), a carnitina ( $7,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ), a glucose ( $8,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ), o ácido ascórbico ( $2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ), a albumina ( $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ), o cloreto de cálcio ( $1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ), o cloreto de potássio ( $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ), o cloreto de sódio ( $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) e o sulfato de magnésio ( $9,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ). Todas estas soluções foram preparadas em solução tampão PIPES com pH de 2,8.

## **2.8. Afinidade para o material biomimético**

A constante de ligação entre o MIP e a molécula molde foi estimada numa mistura de 5,0 mg de material com 2,0 ml de solução de creatinina, de concentrações variáveis entre 79,9 e 1598 mg L<sup>-1</sup>. A mistura foi agitada durante 24 h, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente e, posteriormente, deixada em repouso, durante 10 minutos. A concentração livre de creatinina no sobrenadante foi detectada por espectrofotometria de UV/Vis, a 230 nm.

A quantidade de creatinina ligada no polímero foi calculada por subtração da concentração de creatinina livre da concentração de creatinina inicial, tendo por base uma curva de calibração previamente preparada com soluções padrão de creatinina de concentrações entre  $5,7 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> e  $1,1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>.

## **2.9. Análise das amostras**

Os biossensores desenvolvidos foram aplicados na análise de amostras sintéticas de urina e soro. A obtenção de diferentes concentrações de creatinina em urina ou soro foi alcançada por adição de volumes rigorosos e consecutivos de uma solução padrão de creatinina, preparada em solução tampão PIPES 0,002 mol L<sup>-1</sup> de pH 2,8, a um volume de solução inicial de urina ou soro igual a 50,00 mL.

O cálculo da concentração de creatinina nestas amostras foi baseado no traçado prévio de uma curva de calibração, tendo-se substituído o potencial obtido na equação de regressão linear correspondente. Os resultados obtidos e apresentados corresponderam sempre à média de, pelo menos, três leituras. A precisão dos resultados foi calculada através do desvio padrão correspondente.

### 3. Resultados experimentais

Neste capítulo são apresentados alguns dados de natureza qualitativa sobre os materiais biomiméticos desenhados para interação com a creatinina. De uma forma geral, apresentam-se dois tipos de materiais, edificados com monómeros de MAA ou VP e usando sempre o mesmo agente de reticulação. De modo a aferir o efeito da impressão na resposta dos materiais MIP à presença da creatinina, foram também preparados e avaliados materiais de controlo, NIP, obtidos sem impressão molecular. A afinidade de ligação entre estes materiais e a creatinina foi também avaliada com base em estudos cinéticos.

Todos os materiais descritos foram integrados em membranas seletivas de ESIs, preparadas com ou sem aditivo iónico lipófilo. As características gerais de funcionamento dos elétrodos assim obtidos foram avaliadas, comparadas e apresentadas posteriormente, tendo-se usado também membranas de controlo como forma de garantir que as diferenças de comportamento observadas se associavam apenas aos materiais usados como permutador. Apresentam-se ainda estudos de seletividade destas membranas e por fim a sua aplicação a amostras reais.

#### **3.1. Análise de superfície dos materiais**

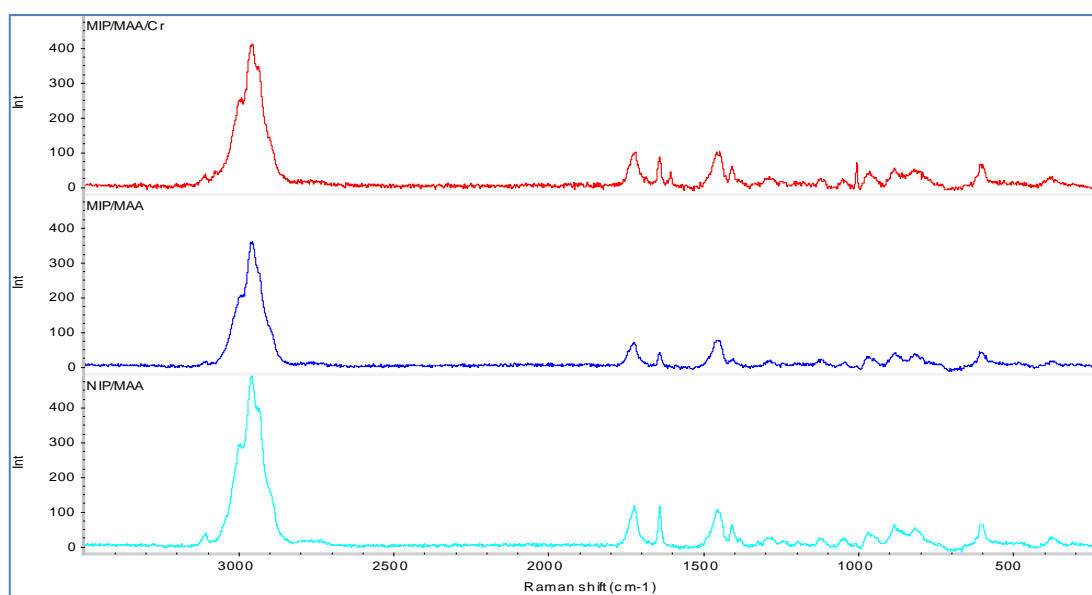
Os espectros de Raman foram traçados tendo em vista estabelecer algumas considerações sobre a homogeneidade dos materiais e a presença ou não da molécula na impressão. Por sua vez, a composição química dos materiais poliméricos e a possível presença de creatinina na matriz sólida foram avaliadas com base na comparação de espectros de FTIR dos materiais sólidos e dos sobrenadantes resultantes da lavagem.

Os resultados apresentados de seguida foram separados de acordo com o monómero utilizado no processo de polimerização.

### 3.1.1. Materiais de MAA

Na figura 3-1 encontra-se representado o espectro de Raman obtido por microscopia confocal dos materiais NIP e MIP preparados com monómeros de MAA. Os materiais MIP foram testados antes (MIP/MAA/Cr) e depois (MIP/MAA) da remoção da creatinina.

Tal como esperado, observaram-se diferenças nos espectros dos materiais MIP/MAA/Cr e MIP/MAA. Estas diferenças localizaram-se a valores de deslocamento de Raman de  $\sim 1000$  e  $\sim 1600$   $\text{cm}^{-1}$ , através da presença de dois picos de baixa intensidade de Raman apenas no material MIP/MAA/Cr. Estes picos confirmaram a presença de creatinina na matriz polimérica, uma vez que este era também evidente no espectro do sólido puro de creatinina (espectro não apresentado), apresentando-se genericamente com o mesmo formato e no mesmo valor de deslocamento de Raman.

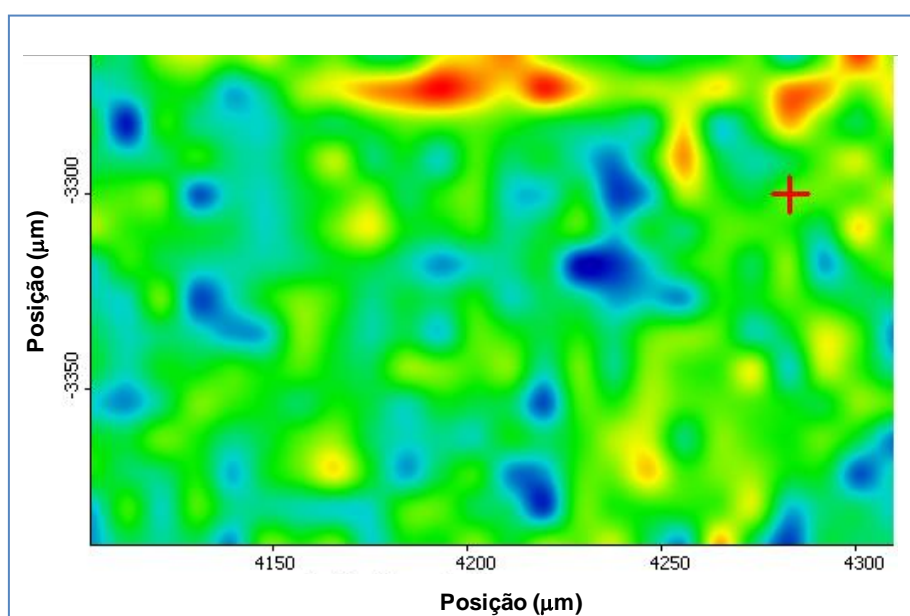


**Figura 3-1** Espectro de Raman da superfície de materiais preparados em MAA, incluindo-se NIP (3º espectro) e MIP antes (1º espectro) e depois da remoção da creatinina (2º espectro).

Considerando que os materiais MIP e NIP de MAA deveriam apresentar a mesma constituição química, seria de esperar que os espectros de Raman correspondentes não apresentassem diferenças muito evidentes. Efetivamente, os espectros obtidos foram quase sobrepostos, com exceção da variação da razão entre as intensidades dos picos localizados

à esquerda e à direita de  $1700\text{ cm}^{-1}$  e de  $1450\text{ cm}^{-1}$ . Esta variação pode induzir a existência de diferenças físicas na organização estrutural da matriz polimérica, algo que seria natural já que a presença da creatinina na preparação do MIP constituiu um obstáculo ao crescimento das cadeias poliméricas.

No sentido de avaliar a homogeneidade do material do ponto de vista do seu comportamento espectral em Raman e de detetar a possível presença de creatinina no sólido após a sua lavagem, foram traçados vários espectros numa área de amostragem de  $210\text{ }\mu\text{m} \times 130\text{ }\mu\text{m}$ . O mapa de superfície obtido encontra-se indicado na Figura 3-2.

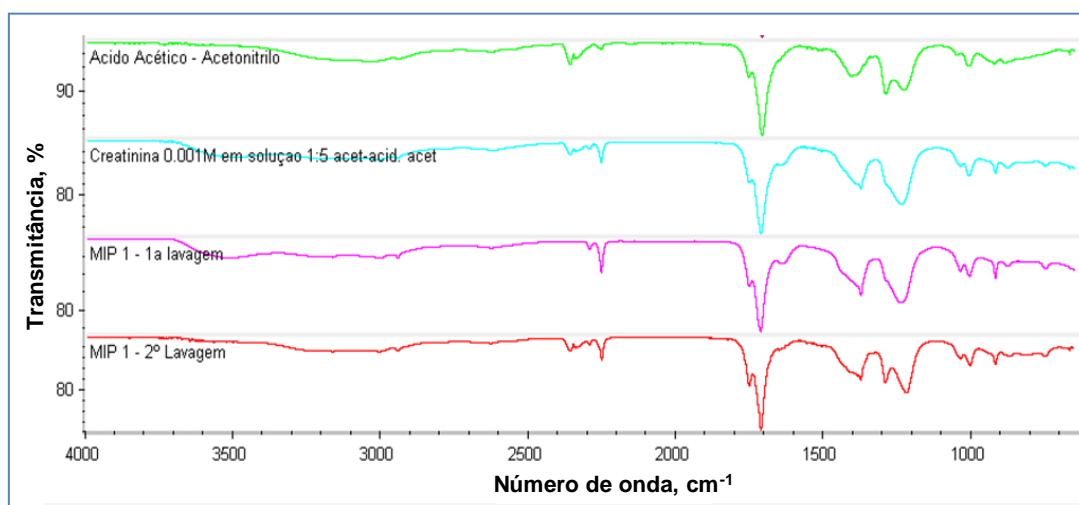


**Figura 3-2** Mapa de distribuição de intensidade de Raman da superfície do material MIP/MAA após extração de creatinina, representado para o deslocamento de  $1000\text{ cm}^{-1}$ .

O mapa de superfície apresentado considerou a variação da intensidade de Raman para o deslocamento de Raman de  $1000\text{ cm}^{-1}$ , um sinal que apenas estaria presente caso existisse creatinina na amostra analisada. As cores apresentadas na figura relacionam-se com a intensidade de Raman observada no local analisado, correspondendo a cor vermelha ao valor máximo de intensidade (+2) e a cor azul ao valor mínimo (-2). Os resultados obtidos indicaram claramente que o material MIP/MAA apresentava uma elevada homogeneidade na região de deslocamento analisada e que a possível presença de creatinina estava confinada a uma área muito reduzida. A elevada uniformidade do material analisado foi

também confirmada nos mapas de distribuição de intensidade de Raman, quando observados para outros valores de deslocamento.

A validação da lavagem do material foi feita ainda por análise comparativa de espectros da solução sobrenadante das diferentes lavagens em FTIR/ATR, uma solução pura de acetonitrilo/ácido acético (5:1 v/v) e uma solução de acetonitrilo/ácido acético (5:1 v/v) contendo creatinina com uma concentração 0,001 M. Os espectros obtidos encontram-se representados na Figura 3-3.



**Figura 3-3** Espectros de FTIR das soluções de lavagem do MIP/MAA, da solução de lavagem sem qualquer creatinina e com creatinina na concentração especificada.

De uma forma geral, a presença da creatinina foi detectada pela existência de absorção de radiação na região dos  $3500\text{ cm}^{-1}$ , resultante das vibrações de estiramento das ligações N-H presentes na creatinina. A análise das soluções de lavagem do sólido por uma segunda vez indicou, com base nesta região, que a creatinina estaria numa concentração inferior àquela que o equipamento de medida seria capaz de detetar. Apesar do FTIR não ser o equipamento ideal para a monitorização de concentrações residuais de creatinina, os resultados indicaram inequivocamente que a quantidade de creatinina no sólido decresceu com significado entre a primeira e a segunda lavagem, contribuindo para inferir sobre o sucesso da extração da molécula modelo da matriz polimérica.

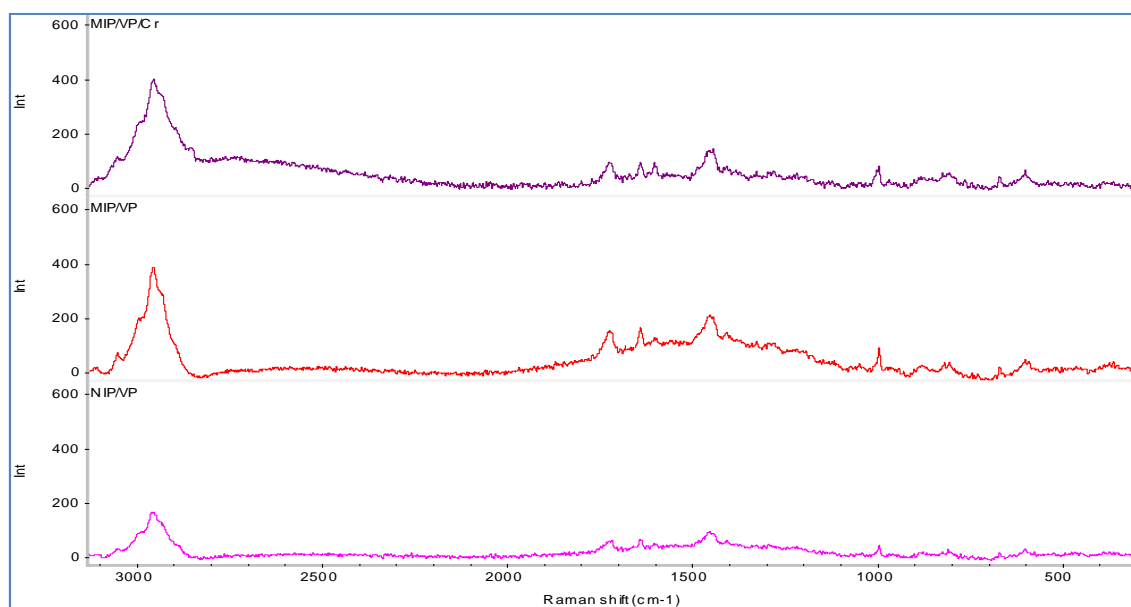
A presença de creatinina causou ainda uma alteração visível nas duas bandas de absorção do solvente localizadas entre  $1200$  e  $1300\text{ cm}^{-1}$ , provavelmente decorrente da presença de grupos amina que partilham os seus eletrões não conjugados com os grupos



vizinhos, através da sua deslocalização. O comportamento espectral da segunda solução de lavagem confirma, também, a eficácia do processo de lavagem na remoção da creatinina.

### 3.1.2. Materiais de VP

O estudo efetuado para os materiais de VP foi genericamente análogo ao realizado para os materiais de MAA. Na figura 3-4 encontra-se representado o espectro de Raman obtido por microscopia confocal dos materiais NIP e MIP preparados com monómeros de VP, testados antes (MIP/VP/Cr) e depois (MIP/VP) de remover a creatinina.

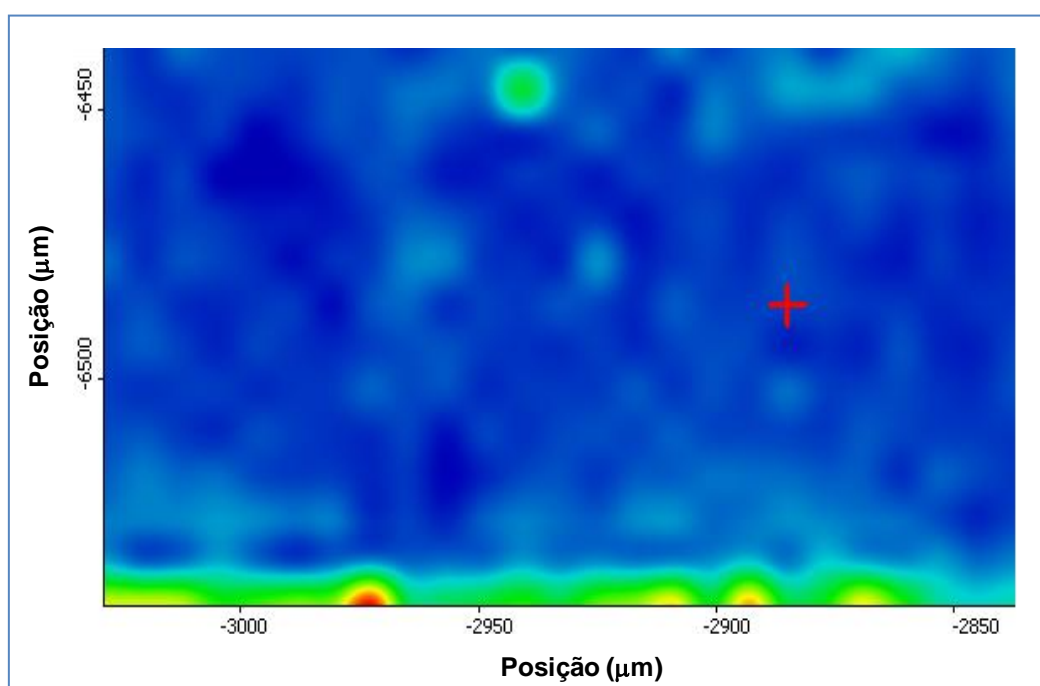


**Figura 3-4** Espectro de Raman da superfície dos MIPs e NIP preparados em VP.

A única diferença observada entre os espectros dos materiais MIP/VP/Cr e MIP/VP prende-se com a presença de um pico de baixa intensidade de Raman ao deslocamento de Raman de  $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  no material MIP que contém creatinina. A ausência deste pico no material correspondente lavado e no material NIP sugere, por isso, que a sua presença decorre da creatinina.

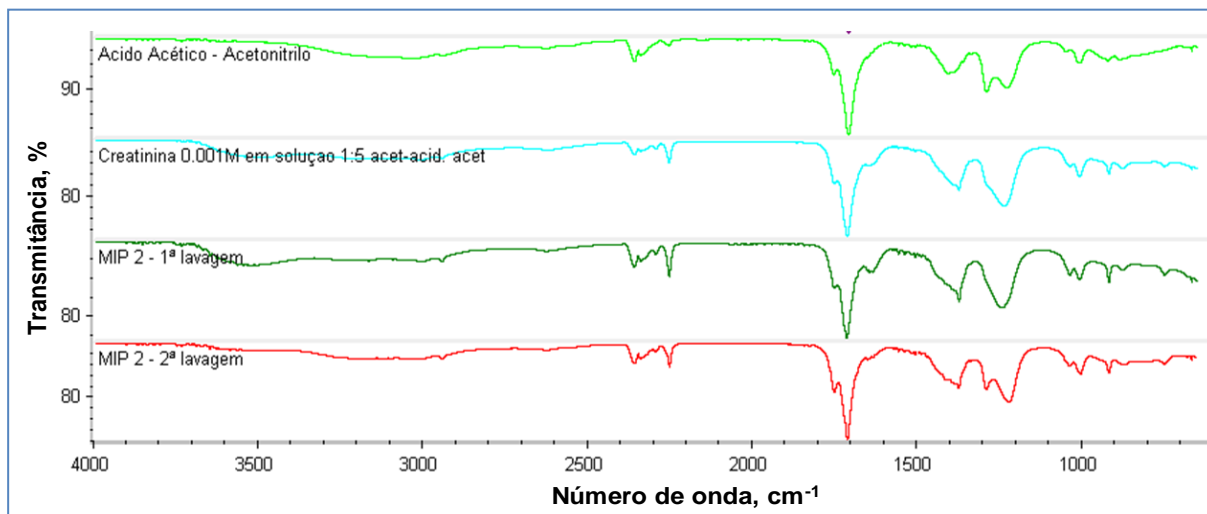
Comparando com os espectros de materiais MAA, os espectros de Raman dos materiais baseados em VP exibem uma fluorescência superior, provavelmente associada à presença do anel aromático da piridina, algo que reduz a intensidade de Raman passível de ser medida e, consequentemente, dificulta a interpretação dos espectros obtidos.

O mapa de superfície do material VP após remoção de creatinina foi obtido numa área de amostragem de  $210\ \mu\text{m} \times 130\ \mu\text{m}$  e para um deslocamento de Raman igual a na intensidade de  $1000\ \text{cm}^{-1}$ , encontrando-se representado na Figura 3-5. Os resultados obtidos sugeriram uma elevada homogeneidade do material e que a possível presença de creatinina deveria corresponder a apenas aproximadamente 14 % da área analisada. Os mapas de distribuição de intensidade de Raman, observados a outros valores de deslocamento confirmaram também a elevada uniformidade deste material.



**Figura 3-5** Mapa de distribuição de intensidade de Raman da superfície do material MIP/VP após extração de creatinina, representado para o deslocamento de  $1000\ \text{cm}^{-1}$ .

Os espectros de FTIR relativos ao controlo da lavagem do material MIP/VP encontram-se representados na Figura 3-6. Os resultados aqui obtidos foram semelhantes aos registados com os materiais baseados em MAA. Todas as considerações apresentadas no ponto anterior relativamente aos espectros de FTIR foram, por isso, aplicáveis a estes registos de materiais VP. No essencial, os resultados indicaram que o solvente utilizado foi capaz de remover creatinina da matriz polimérica, induzindo informação sobre a eficiência deste processo.



**Figura 3-6** Espectros de FTIR das soluções de lavagem do MIP/VP, da solução de lavagem sem qualquer creatinina e com creatinina na concentração especificada.

Os estudos seguintes pretenderam tipificar e comparar os materiais no que diz respeito à sua afinidade para com o composto impresso.

### 3.2. Afinidade dos materiais para a creatinina

Os estudos que avaliam a afinidade de ligação entre materiais MIP e a sua molécula alvo são tipicamente efetuados com base no traçado de isotérmicas de adsorção. Este traçado fornece dados sobre as energias de ligação das moléculas com a superfície adsorvente. No presente estudo, a capacidade de ligação dos MIPs foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$Q = \frac{\mu\text{mol(OXY bound)}}{\text{g(MIP)}} = \frac{(C_i - C_f)V_s \times 1000}{M_{\text{MIP}}} \quad (\text{equação 3.1})$$

onde Q é a capacidade de ligação do material ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ),  $C_i$  a concentração inicial de creatinina ( $\mu\text{mol ml}^{-1}$ );  $V_s$  o volume de solução testada (mL), e  $M_{\text{MIP}}$  a massa de polímero seco (mg). Os dados obtidos foram adicionalmente processados através da análise de *Scatchard*, que fornece informação importante relativamente às propriedades de ligação da molécula molde à superfície sólida. A equação *Scatchard*,

$$Q/C_{\text{livre}} = (Q_{\text{máx}} - Q)/K_d \quad (\text{equação 3.2})$$

foi aplicada para esta finalidade, onde  $Q$  foi a capacidade de ligação;  $C_{\text{livre}}$  a concentração livre em equilíbrio ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ );  $Q_{\text{máx}}$  a capacidade máxima aparente de ligação; e  $K_d$  a constante de dissociação dos locais de ligação.

O material MIP/MAA revelou duas cinéticas diferentes de interação com a creatinina. A interação mais favorável decorreu inicialmente com valores de  $K_d$  e de  $Q_{\text{máx}}$  iguais a  $237 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $99 \mu\text{mol g}^{-1}$ , respetivamente, quando todos os locais de ligação da creatinina ao material ainda se encontravam por ocupar. Numa segunda fase, a ligação da creatinina não foi tão favorável, já que os locais para a sua interação seriam de menor afinidade, correspondendo a valores de  $K_d$  e  $Q_{\text{máx}}$  iguais a  $9164 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $301 \mu\text{mol g}^{-1}$ , respetivamente.

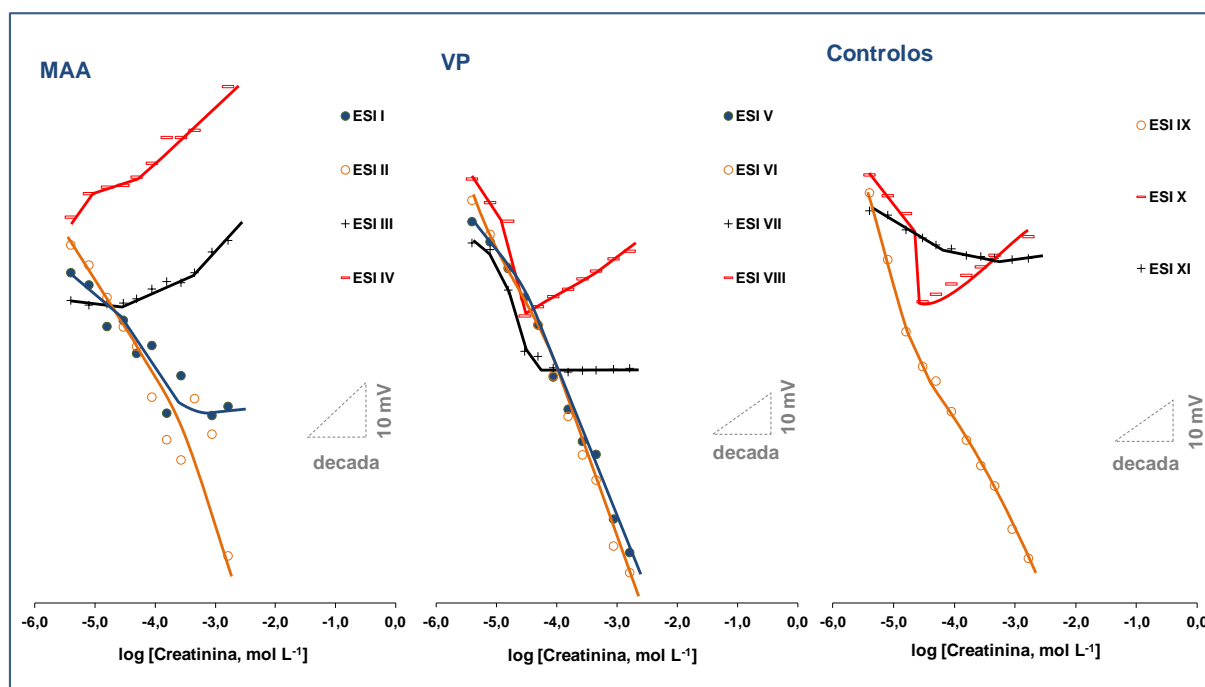
Para o sensor MIP/VP não foi possível encontrar valores de cinética de reação pois os dados obtidos não foram consistentes. É possível que esta inconsistência possa ter tido origem na libertação da rede polimérica, de modo irregular, de monómeros de VP que tenham contribuído também para um aumento de absorvância detectada. Independentemente da inconsistência dos resultados, foi possível verificar que o material adsorveu creatinina, uma vez que a concentração final obtida era genericamente inferior à concentração de creatinina na solução em que estes materiais eram incubados.

De uma forma geral, os resultados obtidos confirmaram a existência de afinidade entre os materiais MIP do tipo MAA ou VP. Não sendo possível a comparação de valores cinéticos entre estes dois materiais, optou-se por preparar membranas seletivas de creatinina com ambos e comparar o seu desempenho nesse formato.

### **3.3. Estudos preliminares de calibração**

Dado que as características gerais de resposta estão grandemente condicionadas pelo pH e pelo meio utilizado para o ajuste da força iónica, os eléctrodos foram inicialmente testados em água. Considerando a estrutura química da creatinina, seria expectável que os ESIs apresentassem declives catiónicos, embora o seu grau de ionização pudesse variar com o meio iónico utilizado.

As representações gráficas típicas das curvas de calibração dos vários elétrodos em água desionizada apresentam-se na figura seguinte, permitindo visualizar o comportamento geral dos vários elétrodos. Os dados analíticos médios de maior relevância extraídos a partir destas calibrações encontram-se resumidos na tabela 3-1.



**Figura 3-7** Representação gráfica das curvas de calibração em água dos diferentes elétrodos, agrupadas segundo o material sensor que continham.

De uma forma geral, nenhum dos sistemas sensores constituídos sem aditivo iónico lipófilo foi capaz de produzir uma resposta potenciométrica aceitável. Os declives observados para estes elétrodos foram contrários aos esperados, deixando antever a existência de um efeito capaz de alterar o potencial de membrana, mas que não se associaria à presença de creatinina na interface membrana/solução.

Apenas alguns dos elétrodos preparados com membranas de aditivos lipófilos, especificamente os ESIs III, IV, VIII e X, apresentaram declives catiónicos. Este efeito foi mais acentuado nas membranas que continham aditivo aniónico, o TpClFB, uma vez que a espécie a detectar era de natureza catiónica. Os declives registados foram, no entanto, bastante reduzidos, bem inferiores a qualquer valor expectável.

**Tabela 3-1** Resultados experimentais das curvas de calibração dos elétrodos avaliados em água, destacando elétrodos com declive catiónico.

Sensor	ESI	Declive (mV década <sup>-1</sup> )			R <sup>2</sup>		LRL (mol L <sup>-1</sup> )	LD (mol L <sup>-1</sup> )
					(n = 3)	Mínimo		
MIP/MAA	I	-10,77	±	7,26	0,9799	0,9651	3,17×10 <sup>-5</sup>	2,57×10 <sup>-5</sup>
NIP/MAA	II	-22,83	±	8,45	0,9794	0,9701	7,81×10 <sup>-6</sup>	5,63×10 <sup>-6</sup>
MIP/MAA/BrTOA	III	8,75	±	9,33	0,9487	0,9093	2,48×10 <sup>-4</sup>	1,64×10 <sup>-4</sup>
MIP/MAA/TpClFB	IV	11,18	±	5,28	0,9404	0,8449	9,52×10 <sup>-5</sup>	6,43×10 <sup>-5</sup>
MIP/VP	V	-33,17	±	18,57	0,9873	0,9834	1,23×10 <sup>-5</sup>	1,17×10 <sup>-5</sup>
NIP/VP	VI	-38,56	±	20,47	0,9826	0,9696	9,26×10 <sup>-5</sup>	5,05×10 <sup>-5</sup>
MIP/VP/BrTOA	VII	0,35	±	4,46	0,9243	0,8437	2,30×10 <sup>-4</sup>	1,71×10 <sup>-4</sup>
MIP/VP/TpClFB	VIII	8,69	±	5,28	0,9816	0,9708	1,88×10 <sup>-5</sup>	1,47×10 <sup>-5</sup>
PVC	IX	-33,55	±	11,00	0,9916	0,9856	3,95×10 <sup>-5</sup>	2,19×10 <sup>-5</sup>
PVC/TpClFB	X	10,68	±	5,38	0,9869	0,9738	1,23×10 <sup>-5</sup>	1,08×10 <sup>-5</sup>
PVC/BrTOA	XI	0,92	±	2,38	0,9130	0,8585	5,29×10 <sup>-4</sup>	4,28×10 <sup>-4</sup>

Estes resultados indicaram, de uma forma geral, que os materiais poliméricos parecem atuar como condutores de carácter neutro, requerendo a presença de uma espécie iónica para conferir propriedades elétricas à membrana que permitissem a permuta de iões com a solução. Por outro lado, indicaram seguramente a necessidade de testar os elétrodos em condições iónicas diferentes, uma vez que a sensibilidade observada em água foi muito reduzida. Os estudos seguintes prendem-se por isso com a variação de pH do meio, sobretudo na região ácida, que permitirá promover e intensificar a ionização da creatinina.

### 3.4. Efeito do pH

Numa fase inicial, estudou-se o efeito do valor de pH mantendo-se para este efeito a mesma constituição química de fundo. Selecionou-se o tampão HEPES e ajustou-se o seu valor “natural” de pH ao valor desejado, através da adição externa de ácidos/bases simples, no presente caso NaOH ou HCl. Apresentam-se de seguida os resultados obtidos para valores de pH iguais a 7,4; 4,6; e 2,5.

### 3.4.1. HEPES/pH 7,4

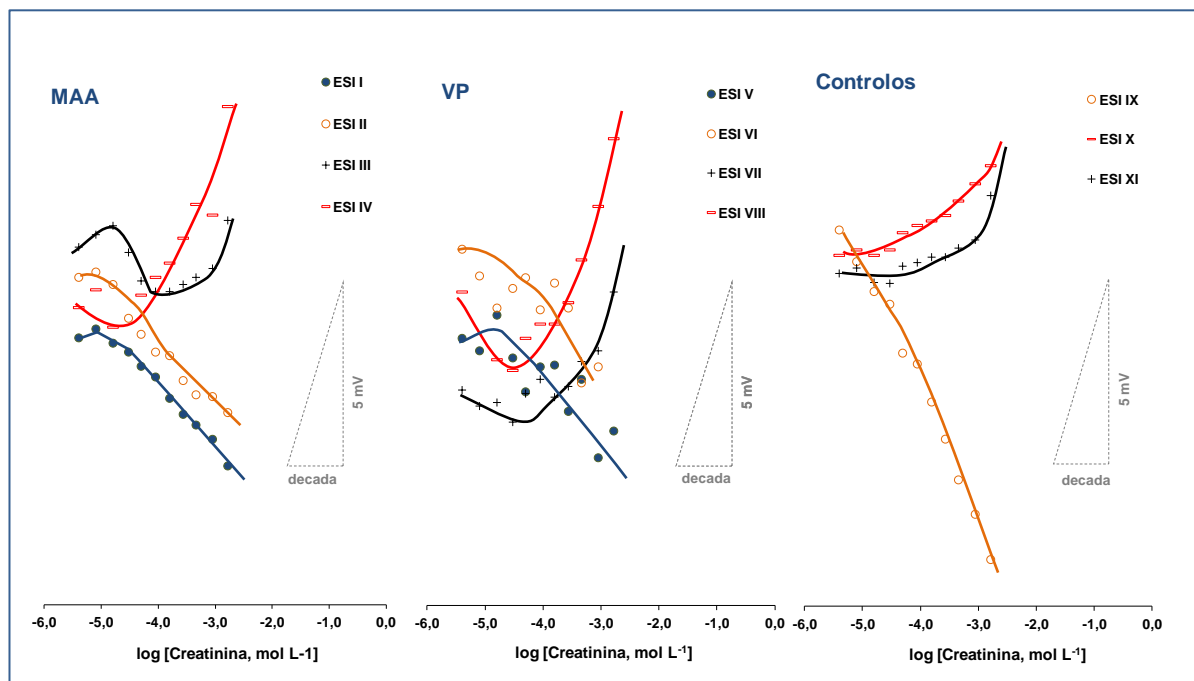
Na tabela 3-2 indicam-se os resultados analíticos médios das calibrações efetuadas em solução tampão HEPES de pH igual a 7,4 unidades. Os gráficos típicos das calibrações correspondentes podem ser encontrados na Figura 3-8.

**Tabela 3-2** Resultados experimentais das curvas de calibração dos elétrodos avaliados em tampão HEPES, pH 7,4, destacando elétrodos com declive catiónico.

Sensor	ESI	Declive (mV década <sup>-1</sup> )			R <sup>2</sup>		LIRL (mol L <sup>-1</sup> )	LD (mol L <sup>-1</sup> )
					(n = 3)	Mínimo		
MIP/MAA	I	-1,78	±	0,23	0,9568	0,9259	8,48×10 <sup>-5</sup>	4,49×10 <sup>-5</sup>
NIP/MAA	II	-1,02	±	1,70	0,9939	0,0087	3,57×10 <sup>-4</sup>	2,20×10 <sup>-4</sup>
MIP/MAA/BrTOA	III	3,61	±	2,29	0,9766	0,9533	5,13×10 <sup>-4</sup>	4,73×10 <sup>-4</sup>
MIP/MAA/TpClFB	IV	3,58	±	0,35	0,9532	0,9444	5,14×10 <sup>-4</sup>	4,08×10 <sup>-5</sup>
MIP/VP	V	-4,52	±	2,85	0,9972	0,9948	3,01×10 <sup>-4</sup>	9,80×10 <sup>-5</sup>
NIP/VP	VI	-185,21	±	258,65	0,9893	0,9787	5,69×10 <sup>-4</sup>	4,39×10 <sup>-4</sup>
MIP/VP/BrTOA	VII	3,56	±	3,27	0,9374	0,8863	3,01×10 <sup>-4</sup>	1,39×10 <sup>-4</sup>
MIP/VP/TpClFB	VIII	4,24	±	189,47	0,7162	0,5111	5,14×10 <sup>-4</sup>	2,96×10 <sup>-5</sup>
PVC	IX	-7,70	±	7,66	0,9442	0,8955	7,89×10 <sup>-5</sup>	4,75×10 <sup>-5</sup>
PVC/TpClFB	X	2,37	±	2,18	0,9405	0,9248	3,89×10 <sup>-5</sup>	1,63×10 <sup>-5</sup>
PVC/BrTOA	XI	3,79	±	0,04	0,9787	0,9574	2,38×10 <sup>-4</sup>	1,36×10 <sup>-4</sup>

De uma forma geral, todos os elétrodos com aditivo iónico, independentemente da sua carga, originaram variações de potencial correspondentes a espécies catiónicas (ESIs III, IV, VII, VIII, X e XI). Estas variações foram contudo de baixa intensidade e de reduzida qualidade do ponto de vista da linearidade alcançada. A presença de declives negativos nos elétrodos I, II, V, VI e IX, que continham apenas material sensor MIP ou NIP, veio confirmar também o carácter permutador neutro destes materiais.

Comparando com os resultados obtidos em água, não houve melhorias que pudessem ser ressaltadas, sendo apenas evidente que o pH 7 não é o mais adequado para a calibração dos biossensores.



**Figura 3-8** Representação gráfica das curvas de calibração em tampão HEPES, pH 7,4, dos diferentes eléctrodos, agrupadas segundo o material sensor que continham.

### 3.4.2. HEPES/pH 4,6

Na tabela 3-3 apresentam-se os dados analíticos médios das calibrações dos eléctrodos em solução tampão HEPES, de pH igual a 4,6. As calibrações típicas correspondentes podem ser observadas na Figura 3-9.

De uma forma geral, o comportamento observado para os eléctrodos com aditivo aniónico melhorou significativamente, originando valores de declive que se poderiam associar a um carácter intermédio entre uma espécie de carga +2 ou +1. A linearidade observada para estes eléctrodos não foi porém a mais adequada, embora esta tivesse melhorado significativamente em comparação com os ensaios anteriores. O comportamento dos demais eléctrodos continuou sem utilidade analítica.

O maior declive obtido nesta fase foi igual a  $40,5 \text{ mV década}^{-1}$ , correspondendo a um coeficiente de correlação mínimo de 0,9784 e a eléctrodos com material sensor de MAA. Comparando os ESIs IV e X, foi possível constatar que esta sensibilidade não resultou apenas da presença do aditivo mas, pelo contrário, o permutador requereu um aditivo para que pudesse desencadear uma resposta analítica útil. O mesmo comentário pode ser

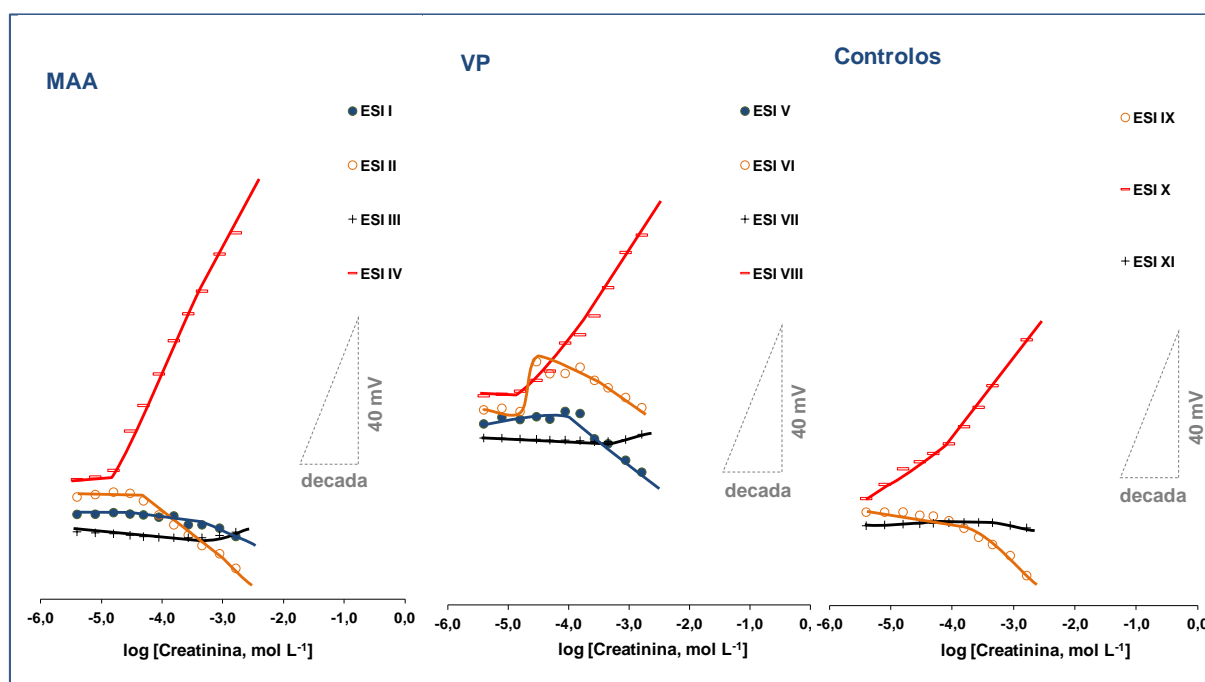


estabelecido para os sensores de VP com aditivo aniónico, embora neste caso a diferença observada entre a sensibilidade dos elétrodos com e sem aditivo não fosse tão significativa.

**Tabela 3-3** Resultados experimentais das curvas de calibração dos elétrodos avaliados em tampão HEPES, pH 4,6, destacando elétrodos com declive catiónico mais elevado.

Sensor	ESI	Declive (mV década <sup>-1</sup> )			R <sup>2</sup>		LIRL (mol L <sup>-1</sup> )	LD (mol L <sup>-1</sup> )
					(n = 3)	Mínimo		
MIP/MAA	I	-8,37	±	1,14	0,9946	0,9918	5,35×10 <sup>-4</sup>	4,35×10 <sup>-4</sup>
NIP/MAA	II	-17,69	±	12,64	0,9811	0,9538	4,58×10 <sup>-4</sup>	3,63×10 <sup>-4</sup>
MIP/MAA/BrTOA	III	6,06	±	3,82	0,9891	0,9740	4,74×10 <sup>-4</sup>	4,83×10 <sup>-4</sup>
MIP/MAA/TpClFB	IV	40,48	±	14,57	0,9850	0,9784	8,73×10 <sup>-5</sup>	6,83×10 <sup>-5</sup>
MIP/VP	V	-17,37	±	9,26	0,9727	0,9455	1,57×10 <sup>-4</sup>	9,30×10 <sup>-5</sup>
NIP/VP	VI	-15,37	±	2,47	0,9866	0,9811	2,55×10 <sup>-4</sup>	1,55×10 <sup>-4</sup>
MIP/VP/BrTOA	VII	2,51	±	3,77	0,9240	0,9213	3,01×10 <sup>-4</sup>	2,54×10 <sup>-4</sup>
MIP/VP/TpClFB	VIII	35,42	±	4,06	0,9878	0,9807	3,70×10 <sup>-5</sup>	2,28×10 <sup>-5</sup>
PVC	IX	-15,61	±	2,71	0,9626	0,9206	1,20×10 <sup>-4</sup>	8,82×10 <sup>-5</sup>
PVC/TpClFB	X	34,77	±	7,36	0,9892	0,9804	4,92×10 <sup>-5</sup>	3,17×10 <sup>-5</sup>
PVC/BrTOA	XI	-3,10	±	0,54	0,9999	0,9845	4,48×10 <sup>-4</sup>	3,16×10 <sup>-4</sup>

De uma forma geral, os resultados melhoraram com o decréscimo do valor de pH, desde que houvesse um aditivo iónico presente na membrana, tendo os materiais MAA exibido um comportamento mais sensível. Os dispositivos correspondentes apresentaram, porém, uma reduzida reprodutibilidade, especialmente no que diz respeito à reprodução das características gerais de calibração.



**Figura 3-9** Representação gráfica das curvas de calibração em tampão HEPES, pH 4,6, dos diferentes elétrodos, agrupadas segundo o material sensor que continham.

### 3.4.3. HEPES/pH 2,5

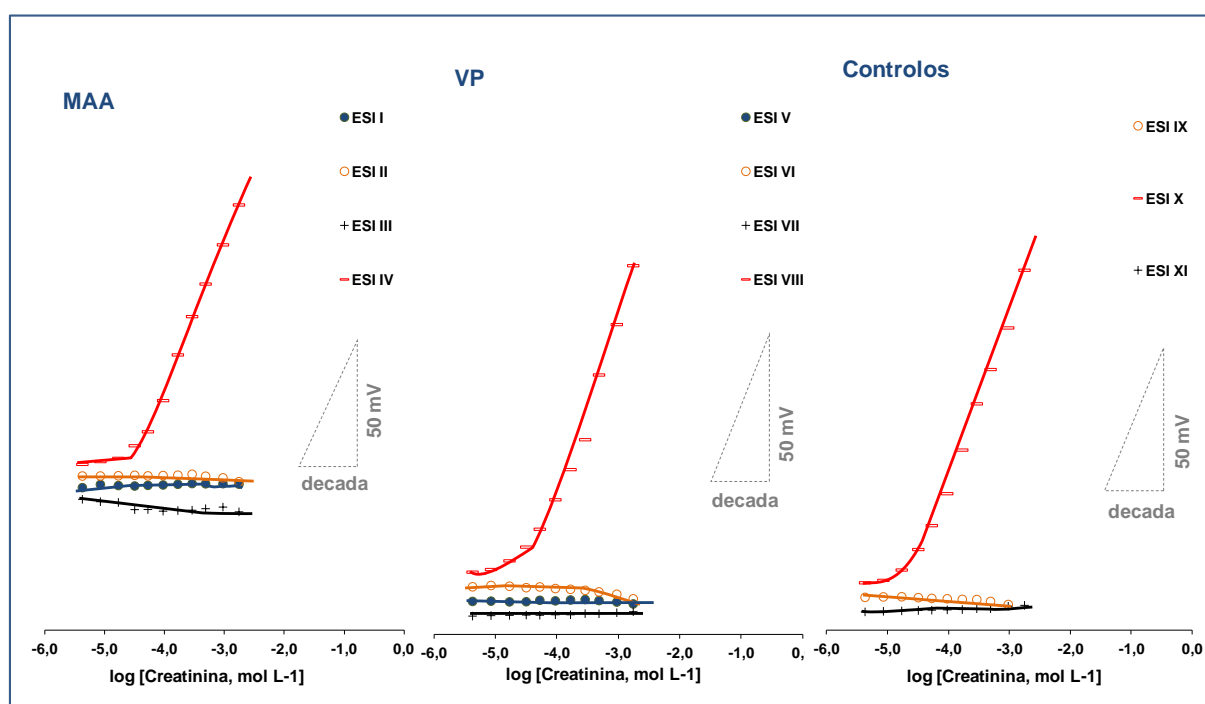
Apresentam-se na tabela 3-4 os dados analíticos médios das curvas de calibração dos elétrodos em solução tampão HEPES, de pH igual a 2,5 unidades. As calibrações típicas correspondentes encontram-se representadas na Figura 3-10.

Tal como no ensaio anterior, o comportamento observado para os elétrodos com aditivo aniónico melhorou significativamente, originando valores de declive que se poderiam associar ao carácter típico de uma espécie de carga +1. A linearidade observada para estes elétrodos melhorou também, tendo-se obtido pela primeira vez valores de correlação quadráticos superiores a 0,99, especificamente para elétrodos que continham MAA ou VP. Mais uma vez, o comportamento dos demais elétrodos continuou sem utilidade analítica.

"Desenvolvimento e aplicação de um biossensor para monitorização de creatinina, um biomarcador associado a doenças emergentes"

**Tabela 3-4** Resultados experimentais das curvas de calibração dos elétrodos avaliados em tampão HEPES, pH 2,5, destacando elétrodos com declive catiónico mais elevado.

Sensor	ESI	Declive (mV década <sup>-1</sup> )			R <sup>2</sup>		LRL (mol L <sup>-1</sup> )	LD (mol L <sup>-1</sup> )
					(n = 3)	Mínimo		
MIP/MAA	I	-0,89	±	1,81	0,9817	0,9653	1,50×10 <sup>-4</sup>	1,34×10 <sup>-4</sup>
NIP/MAA	II	-4,53	±	1,10	0,9297	0,8733	2,83×10 <sup>-4</sup>	2,50×10 <sup>-4</sup>
MIP/MAA/BrTOA	III	4,42	±	7,25	0,9405	0,8398	4,16×10 <sup>-4</sup>	1,71×10 <sup>-4</sup>
MIP/MAA/TpClFB	IV	58,83	±	8,65	0,9939	0,9929	2,83×10 <sup>-5</sup>	2,15×10 <sup>-5</sup>
MIP/VP	V	-2,81	±	2,96	0,8947	0,7739	1,89×10 <sup>-4</sup>	1,59×10 <sup>-4</sup>
NIP/VP	VI	-4,65	±	3,91	0,9763	0,9543	1,90×10 <sup>-4</sup>	1,54×10 <sup>-4</sup>
MIP/VP/BrTOA	VII	1,13	±	0,55	0,9458	0,9330	6,28×10 <sup>-5</sup>	5,18×10 <sup>-5</sup>
MIP/VP/TpClFB	VIII	66,09	±	13,47	0,9918	0,9871	9,08×10 <sup>-5</sup>	5,73×10 <sup>-5</sup>
PVC	IX	-2,88	±	1,89	0,9304	0,8824	9,02×10 <sup>-5</sup>	8,40×10 <sup>-5</sup>
PVC/TpClFB	X	55,53	±	2,25	0,9840	0,9791	3,31×10 <sup>-4</sup>	2,27×10 <sup>-5</sup>
PVC/BrTOA	XI	1,24	±	0,68	0,9251	0,9017	6,28×10 <sup>-5</sup>	5,18×10 <sup>-5</sup>



**Figura 3-10** Representação gráfica das curvas de calibração em tampão HEPES, pH 2,5, dos diferentes elétrodos, agrupadas segundo o material sensor que continham.

Comparando os elétrodos com aditivo aniónico, os ESIs IV, VIII e X, aquele que apresentou o menor declive, igual a 55,5 mV década<sup>-1</sup>, foi preparado com membranas que

não continham material sensor. Neste sentido, foi possível inferir que a qualidade de resposta potenciométrica observada para os elétrodos não foi da responsabilidade do aditivo *per si*, mas está porém associada à sua presença. Os elétrodos que continham MIP/VP apresentaram o maior declive dos três, igual a  $66,1 \text{ mV década}^{-1}$ , que correspondeu no entanto a um valor *hiper-Nernsteniano*. A reprodutibilidade destas unidades foi também pouco adequada, já que este valor médio de declive se associou a um desvio padrão relativo de 20%. Foi o eletrodo que continha MIP/MAA aquele que forneceu a resposta mais próxima da desejada, apresentando um valor de declive médio próximo do teórico e o melhor coeficiente de correlação linear dos 3 elétrodos. Esta resposta estava ainda associada ao menor limite de linearidade,  $2,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , e ao menor limite de deteção,  $2,15 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

De uma forma geral, os ensaios de calibração nos diferentes valores de pH permitiram inferir que a redução do valor de pH no meio ensaiado favorecia as características de resposta dos elétrodos. Por outro lado, a melhor condição de operação dos elétrodos foi obtida para valores de pH igual a 2,5 unidades. A escolha de valores de pH inferiores a este pareceu na altura pouco adequada; nesta região de pH a concentração da espécie  $\text{H}^+$  tornar-se-ia muito elevada, podendo sobrepor-se à resposta do próprio eletrodo à creatinina, sobretudo porque a relação de concentração entre estes dois iões favoreceria a resposta potenciométrica para o ião  $\text{H}^+$ .

Neste sentido, os resultados sugeriram a escolha de um valor de pH igual a 2,5 unidades para os estudos posteriores. Considerando que as características de resposta dos elétrodos dependem grandemente da composição iónica do meio em geral (não apenas do ião  $\text{H}^+$ ), procedeu-se de seguida à escolha do melhor tampão.

### **3.5. Efeito da natureza da solução tampão**

Os elétrodos construídos foram, nesta fase, testados em diferentes meios com valores de pH próximos de 2,5. Considerando que os testes anteriores tinham usado o reagente HEPES como tampão e que a região de pH seria um pouco extrema para se conseguir obter uma solução tampão com uma capacidade tampão razoável, optou-se pela escolha de outros reagentes de natureza próxima à do HEPES e que permitiram reduzir o pH do meio até os valores de pH desejados. Apresentam-se de seguida os resultados dos ESIs testados em soluções MES e PIPES, preparadas com valores de pH igual a 2,8.

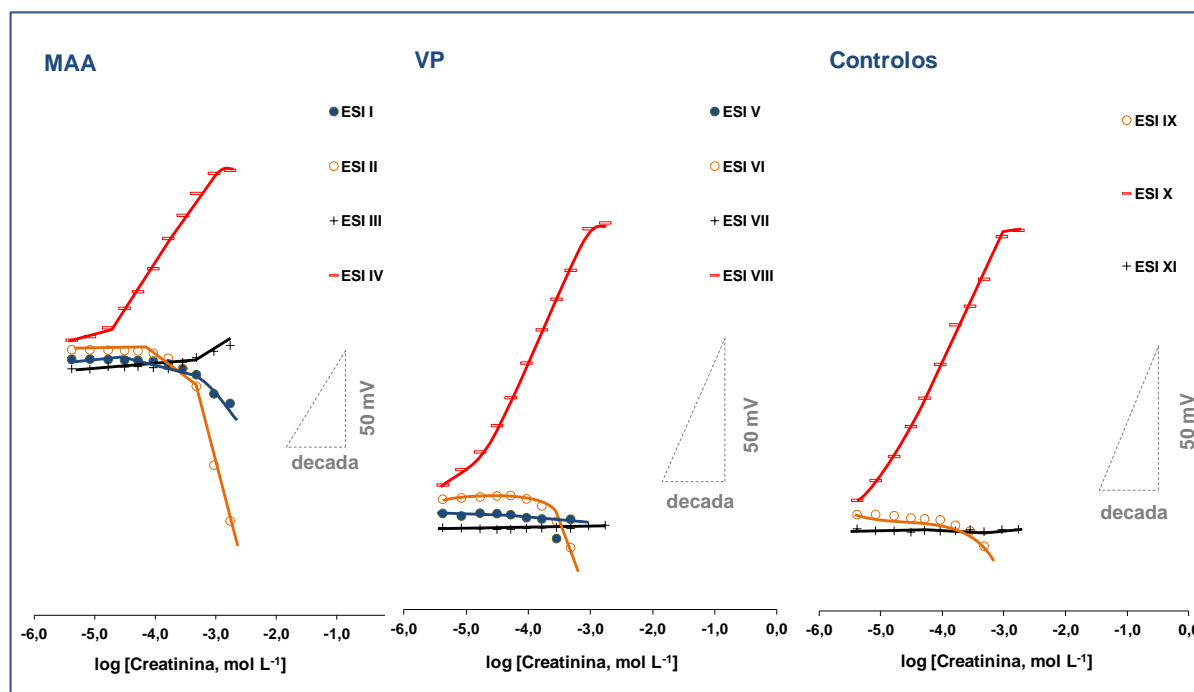
### 3.5.1. MES/pH 2,8

Tal como nos ensaios anteriores, resumem-se na tabela 3-5 os dados analíticos médios das curvas de calibração dos elétrodos em solução tampão MES, de pH igual a 2,8 unidades, apresentando-se na Figura 3-11 as calibrações típicas correspondentes.

Tal como nos resultados anteriores, os elétrodos que apresentaram resposta analítica útil foram apenas aqueles que continham membranas seletivas com aditivo aniónico. Entre estes, e mais uma vez, a menor sensibilidade correspondeu aos elétrodos que não continham material sensor na sua composição. O ESI X apresentou o menor declive, igual a  $39,96 \text{ mV década}^{-1}$ , o maior limite de linearidade, igual a  $5,45 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , embora tenha originado o melhor coeficiente de correlação linear. O ESI VIII apresentou um declive de  $42,09 \text{ mV década}^{-1}$ , com o menor desvio padrão (0,75) e um coeficiente de correlação superior ao elétrodo IV, apresentando ainda as menores concentração de linearidade e de deteção. Por outro lado, o elétrodo IV apresentou o melhor valor de declive, igual a  $45,55 \text{ mV década}^{-1}$ , mas o menor coeficiente de correlação linear dos 3 elétrodos.

**Tabela 3-5** Resultados experimentais das curvas de calibração dos elétrodos avaliados em tampão MES, pH 2,8, destacando elétrodos com declive catiónico mais elevado.

Sensor	ESI	Declive (mV década <sup>-1</sup> )			R <sup>2</sup>		LRL (mol L <sup>-1</sup> )	LD (mol L <sup>-1</sup> )
					(n = 3)	Mínimo		
MIP/MAA	I	-25,89	±	2,20	0,9817	0,9716	$2,78 \times 10^{-4}$	$2,16 \times 10^{-4}$
NIP/MAA	II	-126,13	±	1,08	0,9934	0,9917	$4,68 \times 10^{-4}$	$3,40 \times 10^{-4}$
MIP/MAA/BrTOA	III	11,40	±	2,03	0,9852	0,9571	$2,16 \times 10^{-4}$	$5,99 \times 10^{-5}$
MIP/MAA/TpClFB	IV	45,55	±	3,48	0,9814	0,9800	$2,51 \times 10^{-5}$	$1,13 \times 10^{-5}$
MIP/VP	V	-126,89	±	41,46	0,9767	0,9574	$4,05 \times 10^{-4}$	$2,64 \times 10^{-4}$
NIP/VP	VI	-123,05	±	4,91	0,9912	0,9868	$4,68 \times 10^{-4}$	$2,95 \times 10^{-4}$
MIP/VP/BrTOA	VII	0,80	±	0,57	0,8488	0,6593	$1,33 \times 10^{-4}$	$1,18 \times 10^{-4}$
MIP/VP/TpClFB	VIII	42,09	±	0,75	0,9860	0,9804	$1,36 \times 10^{-5}$	7,43E-06
PVC	IX	-121,17	±	15,70	0,9880	0,9735	$4,05 \times 10^{-4}$	$3,34 \times 10^{-4}$
PVC/TpClFB	X	39,96	±	1,00	0,9864	0,9825	$5,45 \times 10^{-6}$	$5,04 \times 10^{-6}$
PVC/BrTOA	XI	0,93	±	0,65	0,8958	0,7849	$1,63 \times 10^{-4}$	$1,55 \times 10^{-4}$



**Figura 3-11** Representação gráfica das curvas de calibração em tampão MES, pH 2,8, dos diferentes elétrodos, agrupadas segundo o material sensor que continham.

A resposta destes elétrodos em pH 2,8 com solução tampão MES apresentou valores inferiores à resposta obtida em solução tampão HEPES, com declives inferiores e coeficientes de correlação lineares inferiores. Foi ainda possível observar na Figura 3-11 que a resposta dos elétrodos tende a estabilizar para valores concentração de creatinina mais elevados.

### 3.5.2. PIPES/pH 2,8

Os dados analíticos médios das curvas de calibração dos elétrodos em solução tampão PIPES, de pH igual a 2,8 unidades, encontram-se resumidos na tabela 3-6, representando-se na Figura 3-12 as calibrações típicas correspondentes.

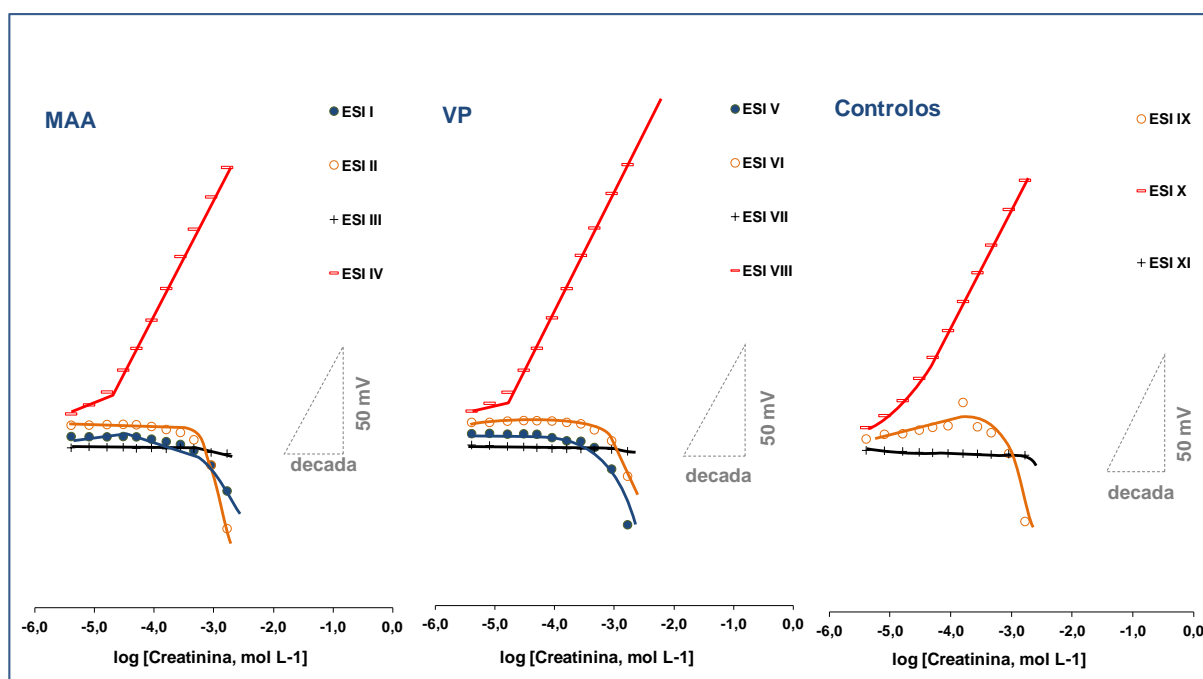
Os resultados obtidos indicaram que os ESIs IV, VIII e X foram, novamente, os que melhor responderam potenciométricamente ao analíto em questão. O ESI X apresentou o menor declive  $50,1 \text{ mV década}^{-1}$ , com um coeficiente de correlação linear superior aos ESIs IV e VIII, mas com um desvio padrão e limite de linearidade superiores. Os elétrodos IV e VIII apresentaram respostas bastante semelhantes, contudo o declive do ESI VIII é ligeiramente superior ( $52,10 \text{ mV década}^{-1}$ ) e com o menor desvio padrão (0,65) e um

"Desenvolvimento e aplicação de um biossensor para monitorização de creatinina, um biomarcador associado a doenças emergentes"

coeficiente de correlação um pouco superior ao elétrico IV. Por outro lado, o elétrico IV apresentou o melhor limite de deteção entre os 3 eléctrodos.

**Tabela 3-6** Resultados experimentais das curvas de calibração dos eléctrodos avaliados em tampão PIPES, pH 2,8, destacando eléctrodos com declive catiónico mais elevado.

Sensor	ESI	Declive (mV década <sup>-1</sup> )			R <sup>2</sup>		LIRL (mol L <sup>-1</sup> )	LD (mol L <sup>-1</sup> )
					(n = 3)	Mínimo		
MIP/MAA	I	-29,74	±	4,19	0,9569	0,9450	4,00×10 <sup>-4</sup>	3,27×10 <sup>-4</sup>
NIP/MAA	II	-70,75	±	9,86	0,9203	0,8977	4,62×10 <sup>-4</sup>	3,15×10 <sup>-4</sup>
MIP/MAA/BrTOA	III	-3,57	±	3,87	0,9395	0,9106	2,49×10 <sup>-4</sup>	1,53×10 <sup>-4</sup>
MIP/MAA/TpClFB	IV	50,56	±	0,88	0,9960	0,9951	1,61×10 <sup>-5</sup>	9,63×10 <sup>-6</sup>
MIP/VP	V	-61,00	±	4,09	0,9154	0,8906	4,62×10 <sup>-4</sup>	4,11×10 <sup>-4</sup>
NIP/VP	VI	-50,49	±	42,86	0,9148	0,8984	3,26×10 <sup>-4</sup>	2,95×10 <sup>-4</sup>
MIP/VP/BrTOA	VII	-1,26	±	0,49	0,9363	0,9017	4,03×10 <sup>-6</sup>	3,98×10 <sup>-6</sup>
MIP/VP/TpClFB	VIII	52,10	±	0,68	0,9977	0,9940	1,61×10 <sup>-5</sup>	1,13×10 <sup>-5</sup>
PVC	IX	-51,02	±	17,07	0,8771	0,8240	3,62×10 <sup>-4</sup>	3,21E-04
PVC/TpClFB	X	50,13	±	1,06	0,9984	0,9960	3,89E×10 <sup>-5</sup>	1,07×10 <sup>-5</sup>
PVC/BrTOA	XI	-0,90	±	0,28	0,9142	0,7975	4,00×10 <sup>-6</sup>	3,98×10 <sup>-6</sup>



**Figura 3-12** Representação gráfica das curvas de calibração em tampão PIPES, pH 2,8, dos diferentes eléctrodos, agrupadas segundo o material sensor que continham.

De uma forma geral, a resposta destes elétrodos em pH 2,8 com solução tampão PIPES apresentou valores de declive um pouco inferiores à resposta obtida em solução tampão HEPES, mas com coeficientes de correlação lineares melhores. Além disso, foi possível perceber-se a partir da Figura 3-12 que a resposta dos elétrodos, ao contrário da resposta em tampão MES, não tende a estabilizar para valores concentração de creatinina mais elevados.

### 3.5.3. Síntese do efeito solução tampão

Os valores obtidos com os elétrodos que continham membranas com aditivo aniónico foram sumariados na tabela 3-7, de modo a facilitar a comparação direta dos resultados obtidos em diferentes meios tampão.

**Tabela 3-7** Resumo dos resultados obtidos com soluções de creatinina preparadas em diferentes soluções tampão

Sensor	ESI	Tampão	Declive (mV década <sup>-1</sup> )			R <sup>2</sup>		LIRL (mol L <sup>-1</sup> )	LD (mol L <sup>-1</sup> )
						(n = 3)	Mínimo		
MIP/MAA/TpCIFB	IV	HEPES pH 2,5	58,83	±	8,65	0,9939	0,9929	2,83×10 <sup>-5</sup>	2,15×10 <sup>-5</sup>
MIP/VP/TpCIFB	VIII		66,09	±	13,47	0,9918	0,9871	9,08×10 <sup>-5</sup>	5,73×10 <sup>-5</sup>
PVC/TpCIFB	X		55,53	±	2,25	0,9840	0,9791	3,31×10 <sup>-5</sup>	2,27×10 <sup>-5</sup>
MIP/MAA/TpCIFB	IV	MES pH 2,8	45,55	±	3,48	0,9814	0,9800	2,51×10 <sup>-5</sup>	1,13×10 <sup>-6</sup>
MIP/VP/TpCIFB	VIII		42,09	±	0,75	0,9860	0,9804	1,36×10 <sup>-5</sup>	7,43×10 <sup>-6</sup>
PVC/TpCIFB	X		39,96	±	1,00	0,9864	0,9825	5,45×10 <sup>-5</sup>	5,04×10 <sup>-6</sup>
MIP/MAA/TpCIFB	VII	PIPES pH 2,8	50,56	±	0,88	0,9960	0,9951	1,61×10 <sup>-5</sup>	9,63×10 <sup>-6</sup>
MIP/VP/TpCIFB	VIII		52,10	±	0,68	0,9977	0,9940	1,61×10 <sup>-5</sup>	1,13×10 <sup>-5</sup>
PVC/TpCIFB	IX		50,13	±	1,06	0,9984	0,9960	3,89×10 <sup>-5</sup>	1,07×10 <sup>-5</sup>

De uma forma geral, verificou-se que a solução tampão PIPES apresentou os melhores coeficientes de correlação linear, tanto médios como mínimos, apresentando ainda os melhores valores de LIRL e de LD, apresentando o menor desvio ao declive das curvas de calibração e apresentando valores de declive próximos dos valores teóricos.



Neste sentido, os estudos posteriores, que dizem respeito aos ensaios de seletividade e de aplicação dos elétrodos na análise de amostras biológicas, foram realizados recorrendo sempre a este tampão, com o valor igual a pH 2,8.

### 3.6. Seletividade dos sensores

O comportamento de seletividade dos ESIs foi analisado através do cálculo dos valores de coeficiente de seletividade  $K_{A,B}^{POT}$ . O método utilizado para este cálculo foi o método *matched potential*, aqui designado por método dos potenciais equivalentes. Este método identificou, sempre que possível, a concentração de interferente necessária para promover uma variação de potencial equivalente àquela originada pelo ião de interesse em solução numa concentração conhecida. O coeficiente de seletividade potenciométrica foi calculado com base na equação seguinte:

$$\log K_{A,B}^{pot} = \frac{a'_A - a_A}{a_B} \quad (\text{equação 3.3})$$

Na equação anterior,  $A$  representa o ião principal e  $B$  representa o ião interferente. Os interferentes considerados neste estudo foram ureia, carnitina, glucose, ácido ascórbico, albumina, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, cloreto de sódio e sulfato de magnésio. Para este efeito, foram adicionadas diferentes alíquotas das soluções relativas à solução que continha o ião principal até ser alcançada a mesma variação de potencial, assegurando que a concentração final não fosse substancialmente alterada. Quando esta condição não foi assegurada, optou-se por identificar as concentrações máximas permitidas no ensaio e para as quais não foi possível observar a variação de potencial desejada. Estas concentrações foram identificadas como "tolerância", uma vez que estas correspondem a valores de concentração tolerados pelos elétrodos. Estes valores de tolerância correspondem sempre às concentrações máximas testadas, pelo que a utilização de concentrações superiores não implica a existência de qualquer interferência. Apresentam-se na tabela 3-8 os resultados obtidos neste estudo.

**Tabela 3-8** Avaliação dos coeficientes seletividade de espécies interferentes.

Espécie Interferente	ESI IV		ESI VIII		ESI X	
	Tolerância (mol L <sup>-1</sup> )	log K <sub>pot</sub>	Tolerância (mol L <sup>-1</sup> )	log K <sub>pot</sub>	Tolerância (mol L <sup>-1</sup> )	log K <sub>pot</sub>
Ureia	4,52×10 <sup>-3</sup>	—	4,52×10 <sup>-3</sup>	—	—	-0,26
Carnitina	—	-0,26	—	-0,32	—	-0,29
Glucose	1,04×10 <sup>-3</sup>	—	1,04×10 <sup>-3</sup>	—	1,04×10 <sup>-3</sup>	—
Ácido ascórbico	8,39×10 <sup>-4</sup>	—	8,39×10 <sup>-4</sup>	—	8,39×10 <sup>-4</sup>	—
Albumina	—	-1,04	8,28×10 <sup>-3</sup>	—	—	-1,03
Cloreto de cálcio	2,25×10 <sup>-3</sup>	—	2,25×10 <sup>-3</sup>	—	—	-0,84
Cloreto de potássio	—	-0,84	-	-0,89	-	-1,08
Cloreto de sódio	6,06×10 <sup>-2</sup>	—	6,06×10 <sup>-2</sup>	—	6,06×10 <sup>-2</sup>	—
Sulfato de magnésio	6,86×10 <sup>-4</sup>	—	6,86×10 <sup>-4</sup>	—	6,86×10 <sup>-4</sup>	—

De uma forma geral, os elétrodos com material sensor e aditivo sofreram interferência da carinitina e do cloreto de potássio, sendo quase todas as outras espécies toleradas nas concentrações estudadas. Analisando em maior detalhe os resultados, os valores de  $\log K_{A,B}^{POT}$  do ESI IV para a carnitina, a albumina e o cloreto de potássio foram iguais a -0.26, -1.04 e -0.84, respectivamente. No que respeita ao ESI IV, somente se encontraram valores de  $\log K_{A,B}^{POT}$  para a carnitina e o cloreto de Potássio, com valores iguais a -0.32 e -0.89, respectivamente. No geral, estes valores de coeficiente de seletividade potenciométrica indicaram, mesmo assim, que os ESIs continuaram a apresentar uma resposta preferencial para a creatinina.

Os elétrodos preparados sem material sensor foram efetivamente menos seletivos, detetando-se interferência relativamente à presença de ureia, carnitina, albumina, o cloreto de cálcio e o cloreto de potássio, com valores iguais a -0.26, 0.29, -1.03, -0.84 e -1.08, respectivamente. Este comportamento atribui preferencialmente ao material sensor essa capacidade da membrana seletiva discriminar com maior facilidade a creatinina quando na presença de outros iões.

Posteriormente, dos onze elétrodos construídos, apenas foram selecionados os ESIs IV, VIII e X para analisar amostras de urina e soro enriquecidas com creatinina, pois estes foram os elétrodos que apresentaram resposta analítica útil. Estes ensaios foram realizados preparando o meio com as condições selecionadas anteriormente.

### 3.7. Análise de amostras biológicas

Relativamente às análises de urina, foram consideradas três amostras com concentrações de creatinina entre 31,5 mg/L e 191,2 mg/L. Na tabela 3-9 apresentam-se os resultados obtidos neste estudo.

Foi o eletrodo com a membrana IV que originou os resultados analíticos de melhor qualidade, com percentagens de recuperação médias entre 100,6% e 109,9%. A precisão destes resultados ficou, no entanto, um pouco aquém do desejável, com desvios padrão entre 18,1 e 28,0. Estes valores elevados podem no entanto ser reflexo da influência da matriz da amostra, uma vez que a sua composição apresenta alguma complexidade, sendo bem diferente de uma solução tampão, de composição simples, controlada e conhecida.

**Tabela 3-9** Resultados da análise de amostras de Urina com os ESIs selecionados.

SENSOR	Concentração real (mg/L)	Concentração teórica (mg/L)	% de recuperação		
ESI IV	31,5	32,4	102,9	±	28,0
	53,0	53,3	100,6	±	24,3
	191,2	210,1	109,9	±	18,1
ESI VIII	31,5	45,5	144,5	±	71,8
	53,0	69,8	131,8	±	56,3
	191,2	227,5	119,0	±	45,1
ESI X	31,5	47,2	149,7	±	67,9
	53,0	74,1	139,9	±	63,2
	191,2	291,1	152,3	±	54,5

No caso das amostras de soro, foram analisadas três amostras com concentrações de creatinina desde 31,1 mg/L até 188,6 mg/L. Na tabela seguinte foram apresentados os resultados obtidos para essas amostras.

**Tabela 3-10** Resultados da análise de amostras de Soro com os ESIs selecionados.

SENSOR	Concentração real (mg/L)	Concentração teórica (mg/L)	% de recuperação		
				±	
ESI IV	31,1	31,1	100,0	±	16,9
	52,3	57,0	109,1	±	25,3
	188,6	236,7	125,5	±	2,0
ESI VIII	31,1	35,4	113,9	±	7,8
	52,3	54,0	103,4	±	5,4
	188,6	231,8	121,5	±	8,7
ESI X	31,1	33,4	107,6	±	18,2
	52,3	47,8	91,5	±	19,8
	188,6	231,8	122,9	±	16,7

De acordo com os resultados obtidos, a qualidade dos valores médios de % de recuperação dependeu da região de concentração em que foram determinados. Os valores mais adequados foram obtidos com amostras que continham concentrações de creatinina iguais a 31,1 ou 52,3 mg L<sup>-1</sup>, desde que analisados com ESIs com materiais MIP na sua constituição. Do ponto de vista da repetibilidade destes resultados, os materiais de MIP/VP revelaram-se os mais adequados, com desvios padrão relativos sempre inferiores a 7%.

Os resultados obtidos demonstraram claramente a necessidade da presença de uma material sensor na membrana, uma vez que os eléctrodos que apenas continham aditivo apresentaram um desempenho limitado, tanto do ponto de vista da exatidão como da precisão. Os resultados sugeriram ainda que as análises a amostras reais deveriam ser realizadas nas regiões mais baixas de concentração e especialmente com os materiais MIP à base de VP.

## 4. Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

Neste trabalho, aplicou-se com sucesso a técnica de impressão molecular na produção de materiais sensores de creatinina. Estes materiais foram preparados com monómeros diferentes, cujos grupos eram ácido carboxílico ou piridina, tendo em vista identificar qual destes originaria uma maior afinidade e seletividade para com a molécula alvo.

A incorporação destes materiais em membranas poliméricas seletivas, na qualidade de material sensor, permitiu concluir que a operação analítica dos elétrodos correspondentes era muito semelhante, quando as avaliações foram realizadas em soluções padrão. Estes materiais apresentaram sempre um comportamento de permutador neutro, dada a necessidade sistemática da presença de um aditivo aniónico na membrana. Foi também possível constatar que a resposta analítica destes elétrodos se encontrava grandemente dependente do valor de pH e da composição do meio. A utilização de meios com valores de pH próximos de 2,5 foi uma condição necessária à obtenção de resposta analítica útil.

As membranas com material sensor MIP de MAA ou VP e que continham aditivo apresentaram boa seletividade, sendo esta melhor do que aquela apresentada pelas membranas que continham apenas aditivo e não tinham qualquer material sensor. Neste sentido, foi possível inferir que os materiais MIP melhoraram as características de seletividade dos elétrodos seletivos à creatinina.

De uma forma geral, os elétrodos seletivos preparados com materiais sensores à base de monómero MAA ou VP e com aditivo aniónico lipófilo apresentaram simplicidade na concepção, limites de deteção relativamente baixos e boa seletividade. Os elétrodos avaliados apresentam ainda a vantagem de serem construídos com um baixo custo, simples

de reproduzir, podendo ser usados como um método alternativo de acompanhamento dos níveis de creatinina em indivíduos afetados por uma redução da sua atividade renal.

Do ponto de vista de aplicação, os dados obtidos apontam para melhores resultados, no caso da urina, com membranas baseadas em materiais de MAA, e no caso do soro, com membranas baseadas em materiais de VP, tanto do ponto de vista de precisão como de exatidão. A qualidade dos resultados analíticos está porém confinada à região de calibração, sendo desejável que as concentrações das amostras diluídas sejam sempre inferiores a  $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ .

Como sugestões para trabalhos futuros, e tendo em vista à melhoria deste trabalho, pode dizer-se que seria interessante reproduzir a metodologia de impressão molecular testando-a em diferentes meios (solventes) e suportes poliméricos. A ligação destes materiais a nanopartículas de ouro ou nanoestruturas de carbono poderia também traduzir-se numa vantagem analítica, dadas as características elétricas especiais destes materiais.

## 5. Referências Bibliográficas

- [1] World Life Expectancy, <http://www.worldlifeexpectancy.com/portugal-kidney-disease>,  
acedido a 12/03/2012.
- [2] SPNews, Jornal da Sociedade Portuguesa de Nefrologia, nº. 16, Dezembro 2009,  
[http://www.spnephro.pt/spnews/PDF's/SPNews\\_n16.pdf](http://www.spnephro.pt/spnews/PDF's/SPNews_n16.pdf),  
acedido a 02/02/2012.
- [3] MG Bastos, GM Kirsztajn, *Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise*, Jornal Brasileiro de Nefrologia, 33 (2011) 93-108.
- [4] MCS Magro, MFF Vattimo, *Avaliação da função renal: creatinina e outros biomarcadores*. Revista Brasileira de Terapia Intensiva, 19 (2007) 182-185.
- [5] R Behrouzian, N Aghdami, *Urinary iodine/creatinine ratio in patients with stomach cancer in Urmia, Islamic Republic of Iran*, Eastern Mediterranean Health Journal, 10 (2004) 921-924.

- [6] JM O'Connor, K Hiibner, AL Rheingold, LM Liable-Sands, *New transition metal binding modes for creatinine: molecular structures of  $[(C_4R_4)Ir(C_4H_7N_3O)(PPh_3)_2Cl]$  and  $[(C_4R_4)Ir(C_4H_7N_3O)(PPh_3)_2BF_4]$ , ( $R = CO_2CH_3$ )*, Polyhedron, 16 (1997) 2029-2035.
- [7] J Delanghe, JP De Slypere, M De Buyzere, J Robbrecht, R Wieme, A Vermeulen, *Normal reference values for creatine, creatinine, and carnitine are lower in vegetarians*, Clinical Chemistry, 35 (1989) 1802–1803.
- [8] Wikipedia, <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Creatinine-tautomerism-2D-skeletal.png>,  
acedido a 24/10/2013
- [9] RN Dalton, *Creatinina sérica e taxa de filtração glomerular: percepção e realidade*. J. Bras. Patol. Med. Lab., 47 (2011) 8-11.
- [10] GLS Nunes, *Avaliação da função renal em pacientes hipertensos / Measurement of kidney function in patient with hypertension*, Rev. Bras. Hipertens, 14 (2007) 162-166.
- [11] National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative, Iniciativa de Qualidade em Resultados de Insuficiência Renal da Fundação Nacional do Rim, 2007  
[http://www.kidney.org/atoz/pdf/international/portuguese/11-10-1204\\_KAI\\_PatBro\\_Anemia\\_1-4\\_Pharmamet\\_Portuguese\\_Nov08.pdf](http://www.kidney.org/atoz/pdf/international/portuguese/11-10-1204_KAI_PatBro_Anemia_1-4_Pharmamet_Portuguese_Nov08.pdf),  
acedido a 10/03/2012.
- [12] E Mohabbati-Kalejahi, V Azimirad, M Bahrami, A Ganbari, *A review on creatinine measurement techniques*, Talanta, 97 (2012) 1-8.
- [13] ACO Costa, JL Costa, FG Tonin, MFM Tavares, GA Micke, *Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of creatinine in urine samples*, Journal of Chromatography A, 1171 (2007) 140-143.



- [14] A Zinellu, MA Caria, C Tavera, S Sotgia, R Chessa, L Deiana, C Carru, *Plasma creatinine and creatine quantification by capillary electrophoresis diode array detector*, Analytical Biochemistry, 342 (2005) 186-193.
- [15] F Uhlin, J Holmar, K Lauri, M Luman, I Fridolin, R Tomson, *Development of a method for optical monitoring of creatinine in the spent dialysate*, Estonian Journal of Engineering, 17 (2011) 140–150.
- [16] LS Ettre, *Nomenclature For Chromatography*, International Union Of Pure And Applied Chemistry, Analytical Chemistry Division, Commission On Chromatography And Other Analytical Separations, Commission On Analytical Nomenclature, Pure and Applied Chemistry, 65 (1993) 819-872.
- [17] APG Gervasio et al., *Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especificação*, Química Nova, 26 (2003) 65-74.
- [18] PS Bonato, VAP Jabor, CM Gaitani, *Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar*, Química Nova, 28 (2005) 683-691.
- [19] C Augustu, G Urtiaga, H Furtado, *Aplicações da Eletroforese Capilar*, Universidade Federal de Pelotas Graduação em Biotecnologia Genômica II, 2011, 29-38, [http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0212144\\_06\\_cap\\_02.pdf](http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0212144_06_cap_02.pdf), acedido a 27/09/2013.
- [20] M Tsuruoka, J Hara, A Hirayama, M Sugimoto, T Soga, WR Shankle, M Tomita, *Capillary electrophoresis-mass spectrometry-based metabolome analysis of serum and saliva from neurodegenerative dementia patients*, Electrophoresis, 34 (2013) 2865-2872
- [21] CG Barbosa, NS Gonçalves, EJH Bechara, NA Assunção, *Potential Diagnostic Assay for Cystinuria by Capillary Electrophoresis Coupled to Mass Spectrometry*, Journal of the Brazilian Chemical Society, 24 (2013) 534-540.

- [22] SP Wang, XC Li, JP Yang, XJ Yang, FH Hou, ZG Chen, *Rapid Determination of Creatinine in Human Urine by Microchip Electrophoresis with LED Induced Fluorescence Detection*, *Chromatographia*, 75 (2012) 1287-1293.
- [23] HH See, J Schmidt-Marzinkowski, W Pormsila, R Morand, S Krahenbuhl, PC Hauser, *Determination of creatine and phosphocreatine in muscle biopsy samples by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection*, *Analytica Chimica Acta*, 727 (2012) 78-82.
- [24] CES Miranda, E Carrilho, AP Gervasio, MF GINE, *Sistemas interfaceados de análise por injeção em fluxo e eletroforese capilar (FIA - CE): desafios, aplicações e perspectivas*, *Química Nova*, 25 (2002) 412-419.
- [25] KG Blass, RJ Thibert, LK Lam, *A Study of the Mechanism of the Jaffe Reaction*, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 12 (1974) 336-343.
- [26] DSK Ng, KG Blass, *Jaffe' reaction products*, *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 24 (1986) 565-570.
- [27] I Hussain, MI Tariq, HL Siddiqui, *Structure elucidation of chromogen resulting from Jaffe's reaction*, *Journal of the Chemical Society Pakistan*, 31 (2009) 937-948.
- [28] S. Narayanan, HD Appleton, *Creatinine: A Review*, *Clinical Chemistry*, 26 (1980), 1119-1126.
- [29] WG Guder, GE Hoffmann, A Hubbuch, WA Poppe, J Siedel, CP Price, *Multicentre evaluation of an enzymatic method for creatinine determination using a sensitive colour reagent*, *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 24 (1986) 889-902.

- [30] KK Fung, CP Chan, R Renneberg, *Development of a creatinine enzyme-based barcode-style lateral-flow assay*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 393 (2009) 1281-1287.
- [31] Chronolab, [http://www.chronolab.com/point-of-care/index.php?option=com\\_content&view=article&id=276&Itemid=41](http://www.chronolab.com/point-of-care/index.php?option=com_content&view=article&id=276&Itemid=41), acedido a 10/03/2012.
- [32] JR Delanghe, MM Speeckaert, *Creatinine determination according to Jaffe—what does it stand for?*, Nephrology Dialysis Transplantation Plus, 4 (2011) 83–86.
- [33] DA Walsh, E Dempsey, *Comparison of electrochemical, electrophoretic and spectrophotometric methods for creatinine determination in biological fluids*, Analytica Chimica Acta, 459 (2002) 187-198.
- [34] Villanova university, *Introduction to Electroanalytical Chemistry*, 2008, [http://www72.homepage.villanova.edu/frederick.vogt/ppt/2008/Intro\\_to\\_Electroanalytical\\_Chemistry.ppt](http://www72.homepage.villanova.edu/frederick.vogt/ppt/2008/Intro_to_Electroanalytical_Chemistry.ppt), acedido a 17/07/2013.
- [35] U Lad, S Khokhar, GM Kale, *Electrochemical Creatinine Biosensors*, Analytical Chemistry, 80 (2008) 7910–7917.
- [36] A Benkert, F Scheller, W Schössler, C Hentschel, B Micheel, O Behrsing, G Scharte, W Stöcklein, A Warsinke, *Development of a Creatinine ELISA and an Amperometric Antibody-Based Creatinine Sensor with a Detection Limit in the Nanomolar Range*, Analytical Chemistry, 72 (2000) 916–921.
- [37] A Benkert, FW Scheller, W Schoessler, B Micheel, A Warsinke, *Size Exclusion Redox-Labeled Immunoassay (SERI): A New Format for Homogeneous Amperometric Creatinine Determination*, Electroanalysis, 12 (2000) 1318–1321.

- [38] EP Randviir, DK Kampouris, CE Banks, *An improved electrochemical creatinine detection method via a Jaffe-based procedure*, Analyst, 138 (2013) 6565-6572.
- [39] CS Pundir, S Yadav, A Kumar, *Creatinine sensors*, Trends in Analytical Chemistry, 50 (2013) 42-52.
- [40] P Vanyšek, *The Glass pH Electrode*, The Electrochemical Society Interface, (2004) 19-20.
- [41] F Scholz, *From the Leiden jar to the discovery of the glass electrode by Max Cremer*, Journal of Solid State Electrochemistry, 15 (2011) 5–14.
- [42] AJ Bard, G Inzelt, colaborador: F Scholz, *Electrochemical Dictionary*, Springer, (2012) 58.
- [43] A Thackray, M Myers, *Arnold O. Beckman: One Hundred Years of Excellence*, Chemical Heritage Foundation, 1 (2000) 147.
- [44] MS Frant, JW Ross Jr., *Electrode for Sensing Fluoride Ion Activity in Solution*, Science, 154 (1966) 1553 – 1555.
- [45] CC Young, *Evolution of Blood Chemistry Analyzers Based on Ion Selective Electrodes*, Journal of the Chemical Education, 74 (1997) 177-182.
- [46] A Bratovčić, A Odošić, S Čatić, *The Advantages of the Use of Ion- Selective Potentiometry in Relation to UV/VIS Spectroscopy*, Agriculturae Conspectus Scientificus, 74 (2009)139-142.
- [47] RP Buck, E Lindner, *Recommendations For Nomenclature Of Ion-Selective Electrodes*, International Union Of Pure And Applied Chemistry, Analytical Chemistry Division,

- Commission On Electroanalytical Chemistry, Pure and Applied Chemistry, 66 (1994) 2527-2536.
- [48] Y Umezawa, P Bühlmann, K Umezawa, K Tohda, S Amemiya, *Potentiometric Selectivity Coefficients of Ion-selective Electrodes*, International Union Of Pure And Applied Chemistry, Analytical Chemistry Division, Commission On Electroanalytical Chemistry, Pure and Applied Chemistry, 72 (2000) 1851–2082.
- [49] Y Umezawa', K Umezawa, H Sato, *Selectivity Coefficients For Methods For Reporting  $K^{POT}$  Values Ion-selective Electrodes: Recommended*, International Union Of Pure And Applied Chemistry, Analytical Chemistry Division, Commission On Electroanalytical Chemistry, Pure and Applied Chemistry, 67 (1995) 507-518.
- [50] X Zhang, H Ju, J Wang, *Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications*, Elsevier, (2008) 71-114.
- [51] Profpc, <http://www.profpc.com.br/eletroqu%C3%ADmica.htm>, acedido a 17/09/2013.
- [52] FH Dickey, *The Preparation Of Specific Adsorbents*, Proceedings of The National Academy of Sciences, 35 (1949) 228-229.
- [53] EC Figueiredo, ACB Dias, MAZ Arruda, *Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos*, Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas, 44 (2008) 361-375.
- [54] CRT Tarley, MDPT Sotomayor, LT Kubota, *Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de extração e separação*, Química Nova, 28 (2005) 1076-1086.

- [55] TJ Li, PY Chen, PC Nien, CY Lin, R. Vittal, TR Ling, KC Ho, *Preparation of a novel molecularly imprinted polymer by the sol-gel process for sensing creatinine*, *Analytica Chimica Acta*, 711 (2012) 83-90.
- [56] C Miura, N Funaya, H Matsunaga, J Haginaka, *Monodisperse, molecularly imprinted polymers for creatinine by modified precipitation polymerization and their applications to creatinine assays for human serum and urine*, *Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis*, (2013) 288-294.
- [57] TA Sergeyeva, LA Gorbach, EV Piletska, SA Piletsky, OO Brovko, LA Honcharova, OD Lutsyk, LM Sergeeva, OA Zinchenko, AV El'skaya, *Colorimetric test-systems for creatinine detection based on composite molecularly imprinted polymer membranes*, *Analytica Chimica Acta*, (2013) 161-168.
- [58] J Haginaka, C Miura, N Funaya, H Matsunaga, *Monodispersed molecularly imprinted polymer for creatinine by modified precipitation polymerization*, *Analytical Sciences*, (2012) 315-317.
- [59] B Gao, Y Li, Z Zhang, *Preparation and recognition performance of creatinine-imprinted material prepared with novel surface-imprinting technique*, *Journal of Chromatography B*, (2010) 2077-2086.
- [60] RY Hsieh, HA Tsai, MJ Syu, *Designing a molecularly imprinted polymer as an artificial receptor for the specific recognition of creatinine in serums*, *Biomaterials*, 27 (2006) 2083-2089.
- [61] HA Tsai, MJ Syu, *Synthesis of creatinine-imprinted poly(beta-cyclodextrin) for the specific binding of creatinine*, *Biomaterials*, (2005) 2759-2766.
- [62] M Subat, AS Borovik, B König, *Synthetic creatinine receptor: imprinting of a Lewis acidic zinc(II)cyclen binding site to shape its molecular recognition selectivity*, *Journal of the American Chemical Society*, (2004) 3185-3190.